

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Sven Mahner

**Vergleich zweier operativer Vorgehensweisen  
im Rahmen der Therapie der CIN III:**

**Klassische LLETZ (Large Loop Excision of the Transformation Zone)  
versus isolierte Resektion der kolposkopisch sichtbaren Läsion**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lea Teresa Etzel

aus München

2018



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Christian Dannecker

Mitberichterstatter: Frau PD Dr. med. Christine Brambs

Frau Prof. Dr. med. Ursula Peschers

Mitbetreuung durch die

promovierte Mitarbeiterin: Frau PD Dr. med. Theresa Kolben

Dekan: Herr Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2018



Meinen lieben Eltern

und

meinem Bruder Lorin



<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen .....	1
1.1.2	Klassifizierung der CIN und anatomisch-histologische Grundlagen der Cervix uteri.....	2
1.1.3	Ätiologie und Risikofaktoren.....	4
1.1.3.1	Humane Papillomaviren (HPV) .....	4
1.1.3.1.1	Charakterisierung, Einteilung und Taxonomie der humanen Papillomaviren.....	5
1.1.3.1.2	Molekulargenetischer Aufbau des humanen Papillomavirus .....	5
1.1.3.1.3	Risikofaktoren für HPV-Infektionen .....	7
1.1.3.1.4	Übertragung der humanen Papillomaviren.....	8
1.1.3.1.5	Prävention der HPV-Infektion.....	9
1.1.3.1.6	Pathogenese der HPV-Infektion.....	9
1.1.3.1.7	HPV Onkogenese .....	10
1.1.3.1.8	Nachweis einer HPV-Infektion.....	11
1.1.4	Screening und Diagnostik .....	12
1.1.5	Therapie .....	15
1.1.5.1	Indikation.....	15
1.1.5.2	Verfahren .....	16
1.1.5.3	Nachsorge und Prognose.....	17
1.1.5.4	Komplikationen.....	19
1.1.5.4.1	Komplikationen postoperativ .....	19
1.1.5.4.2	Komplikationen in der Schwangerschaft .....	19
1.1.5.4.3	Viruspersistenz und Entwicklung zum invasiven Zervixkarzinom	20
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Patientinnen, Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientinnen.....</b>	<b>24</b>
3.1.1	Fallzahlschätzung .....	24
3.1.2	Aufnahmekriterien .....	24
3.1.3	Untersuchungsablauf und Probengewinnung für molekularbiologische Untersuchungen.....	25
3.1.3.1	Untersuchungsablauf .....	25
3.1.3.2	Probengewinnung für molekularbiologische Untersuchungen.....	27
<b>3.2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>

## Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Material .....	28
3.2.1.1	Laborgeräte .....	28
3.2.1.2	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien.....	28
3.2.1.3	DNA-Extraktion .....	29
3.2.1.4	HPV-Genotypisierung-Reagenzien .....	30
3.2.1.5	RNA-Extraktion .....	31
3.2.1.6	cDNA-Synthese.....	31
3.2.1.7	Amplifikation der spezifischen HPV-Onkogene E6/E7 mittels Nested PCR .....	31
3.2.1.8	Gelelektrophorese .....	33
3.2.1.9	Software .....	33
3.2.2	Methoden .....	33
3.2.2.1	Überblick .....	33
3.2.2.2	DNA-Extraktion .....	34
3.2.2.3	HPV-Genotypisierung.....	34
3.2.2.4	RNA Extraktion.....	36
3.2.2.4.1	Prinzip .....	36
3.2.2.4.2	Durchführung .....	37
3.2.2.5	cDNA Synthese.....	38
3.2.2.5.1	Prinzip .....	38
3.2.2.5.2	Durchführung .....	39
3.2.2.6	Amplifikation der spezifischen HPV-Onkogene E6/E7 mittels nested PCR .....	40
3.2.2.6.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	40
3.2.2.6.2	Nested PCR .....	42
3.2.2.7	Gelelektrophorese .....	42
3.2.2.7.1	Prinzip der Gelelektrophorese .....	42
3.2.2.7.2	Durchführung der Gelelektrophorese .....	43
3.2.2.7.3	Auswertung .....	44
3.2.2.8	Statistische Auswertung .....	46
3.2.2.9	Genehmigung der Studie durch die Ethik-Kommission .....	46
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Altersstruktur der Patientinnen .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Primäres Zielkriterium: HPV Test prä- und postoperativ .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>Sekundäre Zielkriterien: Zytologie und Histologie prä- und postoperativ.....</b>	<b>50</b>



4.3.1	Prävalenz und Vergleich der prä- und postoperativen zytologischen Befunde .....	50
4.3.2	Vergleich der histologischen Befunde prä-, intra- und postoperativ .....	51
<b>4.4</b>	<b>Weitere Vergleichsparameter .....</b>	<b>53</b>
4.4.1	Resektionsränder .....	53
4.4.2	Konusvolumina.....	54
<b>4.5</b>	<b>Molekularbiologische Zusatzuntersuchungen .....</b>	<b>56</b>
4.5.1	Genotypisierung .....	56
4.5.1.1	Prävalenz und Vergleich der HPV-Subtypen intra- und postoperativ.....	56
4.5.1.2	Korrelation zwischen HPV-Persistenz und auffälliger Zytologie postoperativ und dem vorbestehenden HPV-Subtypen .....	58
4.5.1.3	Einfluss chirurgischer Intervention an der Cervix uteri auf den HPV-DNA-Nachweis intra- und postoperativ.....	60
4.5.2	Transkriptionsaktivität.....	62
4.5.2.1	Vergleich der intra- und postoperativen Dynamik der Dysplasie in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität .....	62
4.5.2.2	Einfluss der OP-Methode auf die biologische Aktivität der Onkoproteine E6/E7 .....	64
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b>Primäres Zielkriterium: HPV-Nachweis prä- und postoperativ .....</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>Sekundäre Zielkriterien: Zytologie und Histologie prä- und postoperativ.....</b>	<b>70</b>
<b>5.3</b>	<b>Weitere Vergleichsparameter .....</b>	<b>71</b>
5.3.1	Resektionsränder .....	71
5.3.2	Konusvolumina.....	72
<b>5.4</b>	<b>Molekularbiologische Zusatzuntersuchungen .....</b>	<b>73</b>
5.4.1	Genotypisierung .....	73
5.4.1.1	Prävalenz und Vergleich der HPV-Subtypen intra- und postoperativ.....	73
5.4.1.2	Korrelation zwischen HPV-Persistenz, auffälliger Zytologie postoperativ und dem vorbestehenden HPV-Subtypen .....	75
5.4.1.3	Vergleich der beiden OP-Methoden hinsichtlich des Einflusses chirurgischer Intervention an der Cervix uteri auf die Prävalenz der HPV-Genotypen intra- und postoperativ (t=6M) .....	76
5.4.2	Transkriptionsaktivität.....	77

## Inhaltsverzeichnis

---

5.4.2.1	Vergleich der intra- und postoperativen (t=6M) Dynamik der Dysplasie in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität.....	77
5.4.2.2	Vergleich der beiden OP-Methoden hinsichtlich des Einflusses chirurgischer Intervention an der Cervix uteri auf die biologische Aktivität der Onkoproteine E6/E7 intra- und postoperativ (t=6M)	80
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>104</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN)**

Die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) wird durch das Vorliegen nukleärer und zellulärer Atypien des Plattenepithels mit Störung des geweblichen Aufbaus definiert und gilt als Vorstufe des Zervixkarzinoms [2–6].

#### **1.1.1 Epidemiologie des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen**

Das Zervixkarzinom war 2012 weltweit verantwortlich für 265.700 Todesfälle und 527.600 Neuerkrankungen und somit das zweithäufigste diagnostizierte Malignom der Frau [7].

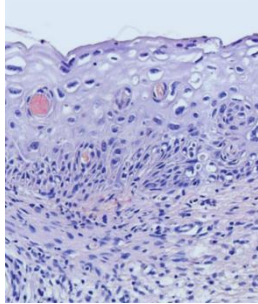
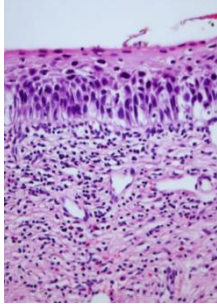
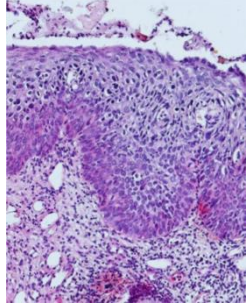
Die Inzidenz für Deutschland liegt bei 4640 Neuerkrankungen und die Mortalität bei 1617 Sterbefällen [8].

Jährlich wird über einer Million Frauen eine CIN I diagnostiziert und 500.000 Frauen erhalten die Diagnose einer hochgradigen Dysplasie, entsprechend einer CIN II oder III [9].

Der Altersgipfel des Zervixkarzinoms liegt zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr, wohingegen Präkanzerosen 10-15 Jahre früher auftreten [10].

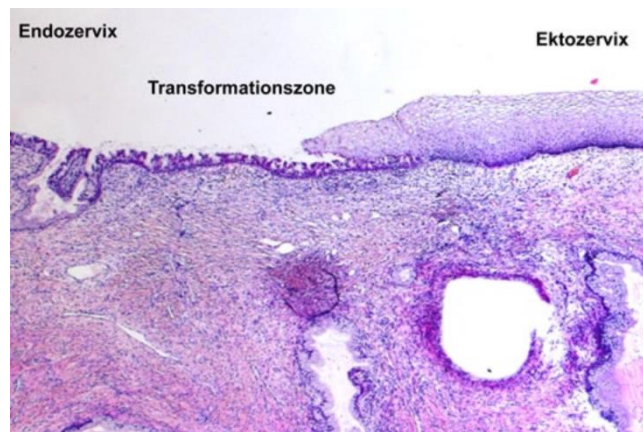
### 1.1.2 Klassifizierung der CIN und anatomisch-histologische Grundlagen der Cervix uteri

Anhand der Ausdehnung und der Schweregrade der Atypien werden drei Grade unterschieden:

	<b>CIN I</b>	<b>CIN II</b>	<b>CIN III</b>
			
WHO-Nomenklatur 2000	Leichte Dysplasie	Mittelschwere Dysplasie	Schwere Dysplasie
III. Münchner Nomenklatur	Gruppe IIID1	Gruppe IIID2	Gruppe IV a-p
Bethesda 2004	Low-grade SIL (LSIL)	High-grade SIL (HSIL)	High-grade SIL (HSIL)

**Tabelle 1.1 Histologische und graphische Einteilung der CIN [6]**

Die entsprechenden Zellveränderungen finden vor allem an der Transformationszone statt. Die Transformationszone ist der Bereich der Zervix, wo das Zylinderepithel der Endozervix auf das Plattenepithel der Ektozervix trifft (siehe Abbildung 1.1) [11, 12]. Die Position der Transformationszone variiert und hängt von der Anatomie der Zervix und dem Hormonstatus ab. Während die Zylinder-Plattenepithelgrenze präpubertär endozervikal liegt, kommt es durch die Hormoneinwirkung im Rahmen der Pubertät zu einer Verschiebung nach ektozervikal. Infolge der zunehmenden vaginalen Azidität wird das nun ektozervikal liegende Zylinderepithel durch metaplastisches Plattenepithel überhäutet [13–15].



**Abbildung 1.1 Histologische Darstellung der Transformationszone [16]**

Ähnliche Arten von Transformationszonen finden sich auch an der Linea dentata im Analkanal und im Oropharyngealbereich [17].

Typisch für die Transformationszone ist, dass die einschichtige zervikale Übergangszone direkt der Basalmembran anliegt und aus embryologischen Zell-Relikten besteht. Das Genexpressionsprofil dieser Grenzzonen-Zellen ist auch im Karzinom nachweisbar [13, 18].

Die persistierende Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) ist ein Risikofaktor für die Entstehung einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie [3, 19]. Die Basalzellschicht besteht aus Stammzellen und den „transient-amplifying cells“, welche sich vorübergehend teilen können. Diese Zellen unterliegen einer aktiven Zellteilung und stellen den Ursprung für die apikalen Zellschichten dar [20–22]. In einer Studie von Lopez et al. wird davon ausgegangen, dass die Infektion von Stammzellen der Cervix uteri durch HPV zu transformierenden Prozessen führt, wohingegen die infizierte Basalzelle zu einer produktiven Infektion führt [23].

Zwischen der Replikation des HP-Virus und der Differenzierung der infizierten Wirtszelle besteht eine enge Verbindung [24]:

Der Infektionszyklus beginnt mit dem Eindringen des HPV in die Basalzelle, da diese einer aktiven Zellteilung unterliegt und somit die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des Virusgenoms gewährleistet wird [22]. Basalzellen teilen sich in Tochterzellen, die im Rahmen ihrer Differenzierung in Richtung Intermediärzellschicht (Stratum superficiale) wandern [25, 26]. Nur die

Parabasalzelle durchläuft die terminale Differenzierung und ist somit für die Virionenproduktion notwendig [27].

### **1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren**

Zahlreiche Studien belegen die Kausalität zwischen einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus und der Entstehung einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie bis hin zum Zervixkarzinom [4, 28–30].

Eine HPV-Infektion persistiert bei jungen und gesunden Frauen circa 12 bis 18 Monate [31]. In der Regel kann das Immunsystem eine dysplastische Veränderung durch eine HPV-Infektion verhindern [32].

Die Infektion kann jedoch in 10% der Fälle anhalten, wodurch sich in der Folge das Risiko für die Entstehung einer hochgradigen Dysplasie bis hin zum Zervixkarzinom erhöht [33–36]. Bei einer Virus-Persistenz von 3 bis 5 Jahren mit dem HPV-Subtypen 16 beträgt das absolute Risiko eine höhergradige Dysplasie zu entwickeln circa 40% [37].

Das größte Risiko für eine Progression in eine hochgradige intraepitheliale Neoplasie bzw. in ein Zervixkarzinom besteht bei Mehrgebärenden, nach langjährigem Gebrauch von Ovulationshemmern [38], Raucherinnen [39, 40] und bei Koinfektion mit anderen sexuell übertragbaren Erregern (zum Beispiel Chlamydia trachomatis oder Herpes simplex Virus-2) [33]. In einer Studie von Mitra et al. wurde gezeigt, dass die mikrobielle vaginale Besiedelung sich entscheidend auf die Persistenz oder Regression einer HPV-Infektion auswirkt. Je höher der Grad der Dysplasie, desto ärmer fiel die vaginale Besiedelung mit Laktobazillen aus [41].

#### **1.1.3.1 Humane Papillomaviren (HPV)**

Etwa 200 verschiedene HPV-Typen wurden in den letzten Jahren erfasst [42, 43]. Viele dieser HPV Typen sind weltweit verbreitet und infizieren Haut- und Schleimhautepithel an bestimmten Stellen des Körpers, vor allem dem Genitaltrakt, Mund-/Rachenraum, sowie Händen und Füßen. Die Infektionen können von gutartigen Tumoren, wie Warzen, bis hin zu bösartigen

Veränderungen des Epithels, wie Plattenepithelkarzinome im Anogenitalbereich und Oropharynx führen [4, 44].

Circa 15% aller bösartigen Tumore werden durch Viren verursacht und fast die Hälfte davon wird auf HPV zurückgeführt [45, 46]. Alle Zervixkarzinome werden durch Subtypen aus der HPV-Hochrisikogruppe ausgelöst [46]. Der deutsche Mediziner Harald zur Hausen wurde 2008 für diese Erkenntnis mit dem Nobelpreis geehrt.

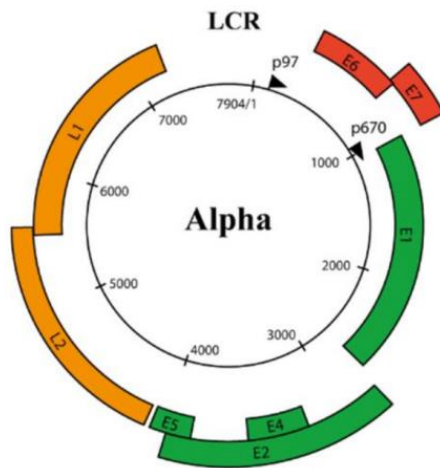
#### **1.1.3.1.1 Charakterisierung, Einteilung und Taxonomie der humanen Papillomaviren**

HPV-Typen sind Genotypen, die sich in 16 Genera unterteilen. Fünf Genera ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ) sind im Menschenaffen entdeckt worden. Nur die alpha-HPV-Viren befallen den Anogenitaltrakt, wohingegen die restlichen 4 Genera die Haut infizieren [47].

Mucosotrope HPV-Subtypen, die den Genitaltrakt befallen, werden in zwei Kategorien eingeteilt, die karzinogenen high-risk-HPV-Typen und die nicht-karzinogenen low-risk-HPV-Typen. Die low-risk-HPV-Typen (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 71, 72, 74, 81, 83) sind für Warzen und genitale Kondylomata verantwortlich [32, 48], wohingegen die high-risk-HPV-Typen hochgradige intraepitheliale Neoplasien oder maligne Tumore (zum Beispiel das Zervixkarzinom) verursachen können. Zu den zwölf high-risk-HPV-Typen zählen: HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59). HPV-68 wird als wahrscheinlich high-risk klassifiziert und weitere sieben Typen werden als mögliche high-risk-HPV-Typen gesehen: HPV-26, -53, -66, -67, -70, -73, -82 [49].

#### **1.1.3.1.2 Molekulargenetischer Aufbau des humanen Papillomavirus**

Humane Papillomaviren sind kleine unbehüllte Doppelstrang-DNA-Viren, die zur Familie der Papovaviridae gehören. Die DNA befindet sich in einem ikosaedrischen Kapsid, das einen Durchmesser von 55 nm misst und aus 72 Kapsomeren besteht. Das Genom ist etwa 8 kbp lang und ringförmig [21, 42, 44, 50].



**Abbildung 1.2 Aufbau des humanen Papillomavirusgenoms [1]**

Das virale HPV-Genom kann in drei Hauptabschnitte unterteilt werden: die frühe E-Region („early region“), die 4 kb lang ist, die späte L-Region („late region“), die 3 kb lang ist und die nichtkodierende Region („LCR = long coding region“ oder „URR = upstream regulatory region“), die 1 kb lang ist und aus verschiedenen cis Elementen besteht. Die cis Elemente regulieren die virale Replikation und die Genexpression [51].

Alle HPV-Typen besitzen ein virales Genom mit durchschnittlich 8 offenen Leserahmen, sogenannte open reading frames (ORF), die sich in 6 „early genes“ (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7) und 2 „late genes“ (L1, L2) unterteilen [21, 50] .

E5, E6 und E7 modulieren die Transformation. E1 und E2 regulieren die Replikation und die Transkription [44].

**E1** fungiert als Replikationsfaktor und als virale DNA-Helikase, die ATP-abhängig dsDNA während der Replikation entwindet [52].

**E2** bindet an Faktoren des Chromatins während der Mitose und heftet dabei virales Genom an Wirtschromosomen. Dabei wird die gleichmäßige Verteilung der Virusgenome auf die Tochterzellen gewährleistet [53]. Außerdem kontrolliert E2 den frühen viralen Promotor, der die Expression von E6, E7, E1 und sich selbst steuert [54].

Sobald das HPV-Genom in die Wirtszelle integriert ist, verliert E2 seine inhibitorische Funktion, die negative Feedback-Kontrolle wird unterbrochen, sodass E6 und E7 überexprimiert werden können [55].

**E4** nimmt Veränderungen des Zytoskeletts in der oberen infizierten Zellschicht des Epithels vor und unterstützt damit die Freisetzung viraler Partikel [56].



Das **E5** Gen kodiert für ein Protein, das mit verschiedenen Membranproteinen Komplexe bildet und hemmende Einflüsse auf autophagozytische Prozesse von Keratinozyten besitzt [3, 57].

**E6** besitzt eine Vielzahl von mutagenen und antiapoptotischen Funktionen. E6 ist dafür verantwortlich, dass fremde DNA in die Wirtszelle integriert werden kann und die Zelle somit immortalisiert wird. Durch die Bindung und Degradierung von p53 kann die beschädigte Zelle den Kontrollpunkt G1/S des Zellzyklus umgehen [3].

**E7** Onkoproteine inaktivieren Komponenten der Retinoblastomgen-Familie (p105 (pRB), p107, p130), indem sie das Tumorsuppressorgen pRb binden und sich daraufhin der Transkriptionsfaktor E2F von pRb ablöst. Dadurch kommt es frühzeitig zu einer Zellzyklusprogression in die S-Phase des Zellzyklus [54, 58–63].

**L1** ist ein Kapsidprotein, mit dem sich produzierende (L1 positiv) von transformierenden Infektionen (L1 negativ) abgrenzen lassen. Die Gensequenz von L1 unterscheidet sich bei jedem HPV-Genotypen und dient deshalb als Einteilung in Spezies und Genre [44]. Der Hauptbestandteil der Oberfläche eines Virions wird von L1 gebildet.

Das Minorkapsidprotein **L2** befindet sich in der Mitte des Pentamers. L2 vermittelt den Transport der viralen DNA aus dem Endosom über das trans Golgi-Netzwerk in den Nukleus [64–67].

#### **1.1.3.1.3 Risikofaktoren für HPV-Infektionen**

Das Risiko sich mit HPV zu infizieren ist abhängig vom Alter der ersten HPV Exposition, der Anzahl der Sexualpartner, der Anzahl der Sexualpartner mit einer high-risk-HPV-Infektion, der Verwendung eines Kondoms, der Genitalhygiene und der Zirkumzision des Mannes [33].

Weitere Risikofaktoren sind: Ethnie (höheres Risiko bei Frauen mit lateinamerikanischer oder schwarzafrikanischer Abstammung) [68], regelmäßiger Alkoholkonsum und Analverkehr [69].

Da das Ansteckungsrisiko mit der sexuellen Aktivität korreliert, sind vor allem junge, sexuell aktive Frauen zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr betroffen [68].

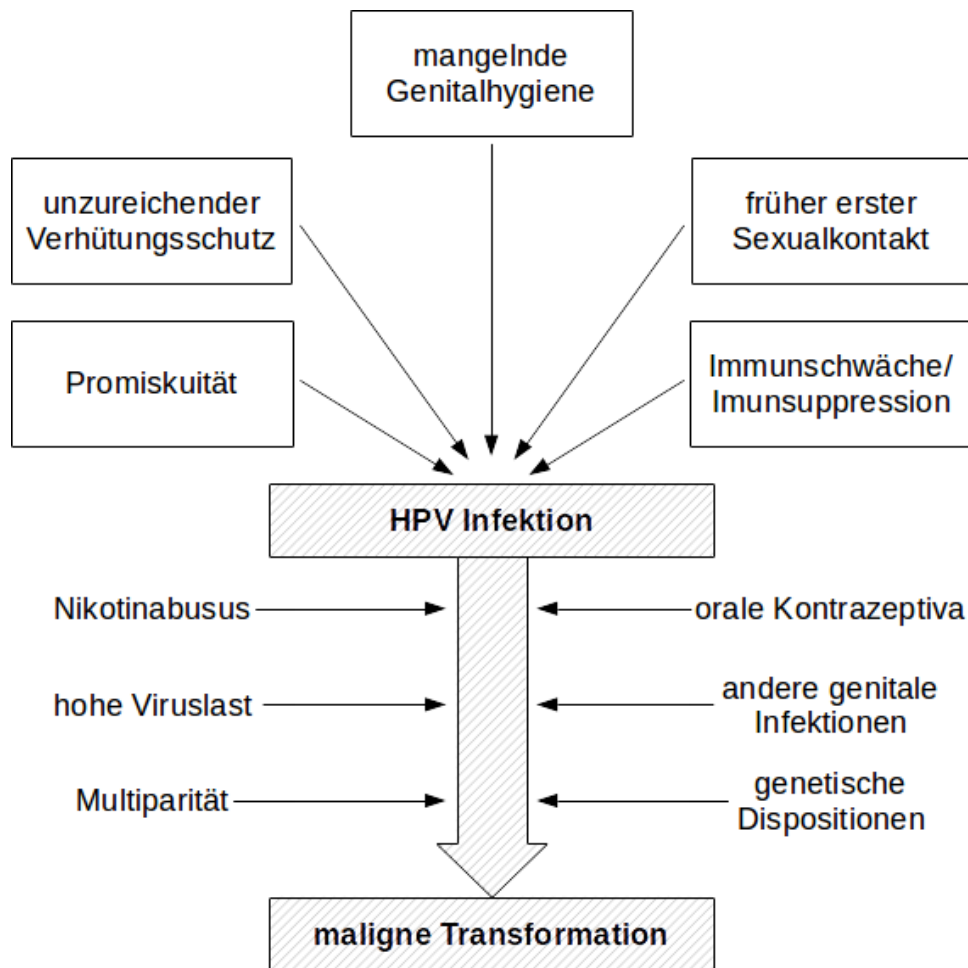


Abbildung 1.3 Risikofaktoren, die eine HPV-Infektion begünstigen und Faktoren, die das Risiko der Entstehung eines Zervixkarzinoms erhöhen (nach [70])

#### 1.1.3.1.4 Übertragung der humanen Papillomaviren

Die meisten HPV-Infektionen werden hauptsächlich durch vaginalen und analen Geschlechtsverkehr verursacht. Außerdem ist eine Übertragung des infizierten Genitaltraktes der Mutter auf das Neugeborene möglich [71, 72].

Ein Kaiserschnitt senkt die perinatale Transmission auf das Neugeborene um 46% [73]. Trotzdem ist eine primäre Sectio erst dann empfohlen, wenn die Anwesenheit von Kondylomen den Geburtsweg behindern und dadurch das Risiko von Verletzungen während der Geburt erhöht sein könnte [74–76].

Außerdem kann die Übertragung digital, oral oder durch Autoinokulation erfolgen [77].

In einer Studie von Casalegno et al. wird beschrieben, dass es durch eine ungenügende Desinfektion der vaginalen Ultraschallsonde zu einer nosokomialen Übertragung von HPV kommen kann [78].

#### **1.1.3.1.5 Prävention der HPV-Infektion**

Aktuell existieren drei Impfstoffe auf dem europäischen Markt:

Cervarix® ist ein bivalenter Impfstoff, der vor Infektionen der HPV-Typen 16 und 18 schützt. Gardasil®, ein quadrivalenter Impfstoff, richtet sich gegen die HPV-Viren 6, 11, 16 und 18 [71].

Seit Juli 2015 ist ein nonavalenter HPV-Impfstoff (Gardasil® 9) mit einem 3-Dosen-Impfschema zugelassen und seit April 2016 auch als 2-Dosen-Impfschema erhältlich. Gardasil® 9 immunisiert zusätzlich zu den HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 auch gegen die high-risk-HPV-Typen 31, 33, 45, 52 und 58 [79].

Die Ständige Deutsche Impfkommision (STIKO) empfiehlt die Impfung von Mädchen im Alter zwischen 9 und 14 Jahren.

Die Impfung kann die Entwicklung von Präkanzerosen am Gebärmutterhals verhindern, dennoch sollten regelmäßige Abstrich-Untersuchungen erfolgen, da sich die Impfung nur gegen die häufigsten Hochrisikotypen richtet [35, 80, 81].

Außerdem verringert die korrekte und konsequente Benutzung eines Kondoms die Wahrscheinlichkeit sich mit HPV zu infizieren [82]. Auch eine begrenzte Anzahl an Sexualpartnern reduziert das Risiko einer Ansteckung mit HPV. Trotzdem bieten diese Präventionsmaßnahmen keine vollständige Sicherheit, die nur durch Enthaltensamkeit erreicht werden kann [71].

#### **1.1.3.1.6 Pathogenese der HPV-Infektion**

Die HPV-Infektion beginnt mit dem Eindringen des Virus in die Basalzellen des Plattenepithels über Mikrotraumata der Epidermis [83]. Durch diese Schleimhautverletzungen, wie sie zum Beispiel im Rahmen von sexueller

Aktivität entstehen können, werden Basalmembrankomponenten, insbesondere Heparansulfatproteoglykan und Laminin 5 freigelegt [84–86]. Das virale L1-Kapsid bindet an Heparansulfatproteoglykan, daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung des L1-Kapsidproteins und das Virus gelangt mittels Endozytose in späte Endosome [87, 88]. Der zunehmende pH-Abfall in den reifenden Endosomen führt zur Freisetzung der viralen Genome in den Zellkern, in dem die virale DNA extrachromosomal vorliegt [89]. Da in dieser Phase der produktiven Infektion nur sehr wenige Zellen infiziert werden und nur eine geringe Zahl an DNA (20 bis 100 virale DNA-Kopien) repliziert wird, ist das Virus in diesem Stadium nur schwer nachweisbar [90]. In diesem frühen Stadium werden vor allem die frühen Onkoproteine E1 und E2 exprimiert.

Die Tochterzelle, die aus der Teilung der Basal- und Parabasalzelle hervorgeht, wandert in das Stratum spinosum und beginnt sich nun zu differenzieren. Im gesunden Epithel verlässt die abgelöste Basalzelle den Zellzyklus und verliert daraufhin ihren Zellkern. Aufgrund des Einflusses des Onkoproteins E7 resultiert in den oberflächlichen, nicht mehr teilungsfähigen Zellen des Stratum spinosums eine massiv gesteigerte Amplifikation des Virusgenoms auf bis zu tausend Kopien pro Zelle [27, 56]. Die Verpackung der Virusgenome erfolgt durch die beiden viralen Kapsidproteine L1 und L2. Die reifen Virionen werden mit Hilfe von abschilfernden Zellen freigesetzt [91].

#### **1.1.3.1.7 HPV Onkogenese**

Die HPV Onkogenese beginnt mit einer Verschiebung des viralen Genexpressionsmusters in den Basalzellen und äußert sich durch eine starke Expression der Onkogene E6 und E7 [3, 92]. Mit Verlust der negativen Feedback-Kontrolle durch E2 durch Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom kommt es zunehmend zu einer verstärkten Expression der Onkogene E6 und E7 [93].

Die Folge einer verstärkten Expression von E7 ist die Initiierung der Expression von Histondemethylasen (KDM6B). Histondemethylasen bewirken eine verstärkte Expression des Zellzykluskontrollproteins p16 Ink4a, das normalerweise in gealterten oder geschädigten Zellen einen irreversiblen

Zellzyklusarrest hervorruft [94]. Je höher der Dysplasiegrad einer Probe, desto ausgeprägter ist die p16-Positivität [95].

In Zervixkarzinom- und CIN-Läsionen kann außerdem eine erhöhte Aktivität der Telomerase gefunden werden. Die Telomerase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (=reverse Transkriptase), die Telomere verlängert, um in Tumorzellen die Zellteilungsfähigkeit aufrecht zu erhalten [96].

Außerdem konnte mit zunehmendem Dysplasiegrad eine Zunahme von Methylierung an CpG-Inseln des viralen Genoms festgestellt werden [97]. Die Methylierung betrifft vor allem die Regionen E2, L2 und L1 des viralen Genoms [98]. Folge der Methylierung ist eine Unterdrückung der viralen Transkription, da Transkriptionsfaktoren keine methylierten Regionen binden können [99].

Die chromosomale Instabilität führt zu Chromosomenfragmenten bei infizierten Zellen, die sich durch den Verlust der Zelldifferenzierung und der fehlenden Produktion von HPV-Virionen äußert. Im Rahmen von Reparaturvorgängen werden HPV-Genomfragmente in die chromosomale Wirts-DNA integriert [100]. Das Virus stoppt mit Beginn der Malignität seinen eigenen Lebenszyklus [54].

#### **1.1.3.1.8 Nachweis einer HPV-Infektion**

Unter den HPV-Nachweisverfahren gibt es erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Einsatzgebiete, der Verfahrensweisen und Ergebnisse.

##### **a) HPV-DNA Test**

Kommerzielle HPV-DNA-Tests basieren entweder auf DNA-Hybridisierung (z.B. Hybrid-Capture-Assay, HC2) oder auf Amplifikation mittels PCR [101].

Bei Patienten mit auffälligen, aber nicht eindeutig pathologischen Zervixabstrichen eignet sich der HPV-DNA Test aufgrund seines hohen negativen Prädiktionswertes sehr gut zur besseren Einschätzung des Abstrichergebnisses [102, 103]. Die PCR zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität, der Hybrid Capture Tests durch eine höhere Spezifität aus [104–106].

### b) HPV RNA Test

Die RNA-Expression, vor allem die Expression der viralen Onkogene E6 und E7, dient als Nachweis einer transformierenden Infektion und kann somit das Risiko für die Entstehung einer Präkanzerose bis hin zu einer Invasion in ein Karzinom evaluieren [107–109]. Vor allem im Frühstadium stellt der Nachweis von E6 und E7 einen wichtigen Prädiktor dar [109, 110].

In über 90 % der diagnostizierten CIN 3 Läsionen und im manifesten Karzinom konnte Castle et al. E6/E7 mRNA nachweisen [109].

Vorteil gegenüber den HPV-DNA-Tests ist die höhere Spezifität, vor allem bei der Detektion von schweren Dysplasien, jedoch mit geringerer Sensitivität [104–106].

### c) HPV-Protein-Nachweis

Aufgrund der geringen Immunität der HPV-Onkoproteine E6 und E7 ist die Herstellung von Antikörpern gegen diese Proteine komplex [111]. Es existieren Antikörper gegen HPV L1, die vor allem auf eine transiente produktive Infektion hinweisen, wobei eine Präkanzerose nicht sicher ausgeschlossen werden kann [112].

## **1.1.4 Screening und Diagnostik**

1970 wurden in Deutschland Krebsfrüherkennungsprogramme eingeführt, die jährlich Frauen ab dem 20. Lebensjahr durch zytologische Abstrichuntersuchungen, den sogenannten Pap-Test, als Präventionsmaßnahme dienen soll [113]. Daraufhin ist die Inzidenzrate des Zervixkarzinoms in Deutschland um 40% und die Mortalitätsrate um die Hälfte gesunken [114].

Die zytologische und histopathologische Diagnostik ist Grundlage für das Erkennen einer neoplastischen Veränderung der Portio. P16/Ki-67-gefärbte Proben und Wirtszell-DNA-Methylierungsanalysen sind weitere Detektierungsmöglichkeiten von hochgradigen intraepithelialen Neoplasien der Cervix [115].

### a) Kolposkopie

Die Kolposkopie ist nicht Teil der regulären Vorsorgeuntersuchung. Bei der Kolposkopie wird die Portio durch eine binokulare Lupe mit unterschiedlichen Vergrößerungen betrachtet. Nachdem die Portio zunächst im Nativzustand inspiziert wird, führt der Untersucher anschließend eine Essigprobe sowie die Schiller'sche Jodprobe durch.

In der Essigprobe wird auf die Portio eine 3-5%ige Essigsäure getupft, um Epithelzellen zum Aufquellen zu bringen und somit atypisches Epithel durch den höheren Proteingehalt von regulären Epithelzellen weiß hervorzuheben [116].

Bei der Schiller'schen Jodprobe reagiert das Jod mit dem Glykogen, das im gesunden Epithel enthalten ist, zu einem tiefbraunen Areal. Da atypisches Epithel weniger Glykogen aufweist und sich nach dem Betupfen mit 1%iger Jodlösung gelbbraun zeigt, lässt sich gesundes von atypischem Epithel differenzieren [116].

### b) Zytologische Diagnostik

Mit einem geeigneten Abnahmeinstrument wird ein Abstrich endo- und ektozervikal entnommen und anschließend auf einem Objektträger ausgerollt, fixiert und nach Papanicolaou gefärbt [117]. Die Beurteilung erfolgt nach der Münchner Nomenklatur III, bzw. außerhalb Deutschlands nach der Bethesda Klassifikation.

<b>Gruppe</b>	<b>Begriffsdefinition</b>	<b>Bethesda-System</b>
0	Unzureichendes Material	Unsatisfactory for evaluation
I	Unauffällige und unverdächtige Befunde	NILM
II a	Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese	NILM
II	Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert	
II-p	Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei CIN 1, auch mit koilozytarem Zytoplasma/Parakeratose	ASC-US
II-g	Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen	AGC endocervical NOS
II-e	Endometriumzellen bei Frauen > 40. Lebensjahr in der zweiten Zyklushälfte	Endometrial cells
III	Unklare bzw. zweifelhafte Befunde	
III-p	CIN 2/3/Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen	ASC-H
III-g	Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, Adenocarcinoma in situ/invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen	AGC endocervical favor neoplastic
III-e	Abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal)	AGC endometrial
III-x	Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs	AGC favor neoplastic
III D	Dysplasie-Befunde mit größerer Regressionsneigung	
III D1	Zellbild einer leichten Dysplasie analog CIN 1	LSIL
III D2	Zellbild einer mäßigen Dysplasie analog CIN 2	HSIL
IV	Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms	
IV a-p	Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ analog CIN 3	HSIL
IV a-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ	AIS
IV b-p	Zellbild einer CIN 3, Invasion nicht auszuschließen	HSIL with features suspicious for invasion
IV b-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen	AIS with features suspicious for invasion
V	Malignom	
V p	Plattenepithelkarzinom	Squamous cell carcinoma
V g	Endozervikales Adenokarzinom	Endocervical adenocarcinoma
V e	Endometriales Adenokarzinom	Endometrial adenocarcinoma
V x	Andere Malignome, auch unklaren Ursprungs	Other malignant neoplasms

Tabelle 1.2 Zytologische Einteilung nach Münchner Nomenklatur III [118]



### c) Histologie

Zur histologischen Sicherung einer kolposkopisch suspekten Läsion, wird die auffälligste Stelle nach Durchführung der Essig- und Jodprobe an der Zervix biopsiert und in Stufenschnitten aufgearbeitet. Die endozervikale Kürettage dient zur Gewebeentnahme aus dem Zervikalkanal. Beurteilt werden die Intaktheit der Basalmembran und Gewebeveränderungen [116]. Die Einteilung des Dysplasiegrades erfolgt anhand der in Tabelle 1.3 aufgeführten Kriterien.

Die Aussagekraft der histologischen Sicherung ist am höchsten bei Entnahme von drei Proben und bei Frauen unter 30 Jahren [119].

<b>CIN I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nachweis atypischer Keratinozyten im unteren Drittel des Plattenepithels mit verschobener Kern-Plasma-Relation und polymorphen Kernen</li> <li>- Nachweis einer Kernachsenorientierungsstörung (Verlust der Polarität; fehlende palisadenartige Anordnung der Kerne)</li> <li>- eventuell Vorkommen von Mitosen</li> <li>- in der Regel dunkles (glykogenarmes) Epithel</li> <li>- Nachweis von Koilozyten</li> <li>- die oberen zwei Drittel des Epithels weisen eine Ausreifung oder HPV-bedingte Veränderung auf</li> </ul>
<b>CIN II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nachweis atypischer Keratinozyten bis in das mittlere Drittel des Plattenepithels</li> <li>- oberflächlich Ausreifung des Epithels</li> </ul>
<b>CIN III</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nachweis atypischer Keratinozyten in der gesamten Dicke des Plattenepithels</li> <li>- oft atypische Mitosen</li> <li>- fehlende Ausreifung des Epithels</li> </ul>

**Tabelle 1.3 Klassifikation von zervikalen intraepithelialen Neoplasien [6, 120]**

### 1.1.5 Therapie

#### 1.1.5.1 Indikation

Bei histologisch gesicherten zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) richtet sich das therapeutische Vorgehen laut der aktuellsten deutschen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) nach dem Schweregrad der Präkanzerose, dem Befall des Endozervikalkanals, dem Alter und dem Wunsch der Patientin:

CIN I:

- Zuwarten im Sinne von kolposkopisch-zytologischen Kontrollen alle 6 Monate bei positivem high-risk-HPV-Test
- Bei Patientinnen mit einer 2-jährigen Persistenz einer CIN I kann eine operative Therapie überlegt werden.

CIN II:

- Zuwarten im Sinne von kolposkopisch-zytologischen Kontrollen alle 6 Monate bei positivem high-risk-HPV-Test
- bei Patientinnen mit einer 1-jährigen Persistenz einer CIN II ist eine Konisation indiziert

CIN III:

- Indikation zur operativen Therapie ist gestellt
- eine Ausnahme hierbei sind schwangere Patientinnen, denen eine operative Vorgehensweise erst zwei Monate postpartal angeraten wird

Endozervikaler Befall:

- Indikation zur operativen Therapie ist gestellt

**1.1.5.2 Verfahren**

Bei der operativen Behandlung werden ablative von exzisionalen Methoden unterschieden:

a) ablative Methoden

Bei der ablativen Methode wird das betroffene Gewebe zerstört [121]. Zu den ablativen Verfahren werden die Kryotherapie, die Laserablation, die Elektrofulguration und die Koagulation gezählt. Bei Patientinnen mit kolposkopisch komplett einsehbarer Läsion und sicherem Ausschluss eines invasiven Karzinoms sind ablative Methoden durchführbar. Zum Ausschluss eines okkulten invasiven Zervixkarzinoms muss vor dem Eingriff eine endozervikale Gewebeentnahme durchgeführt werden [122].

### b) exzisionale Methoden

Methoden der Exzision sind die Messer-, Schlingen- oder Laserkonisation.

Bei der Konisation wird ein konusförmiges Gewebstück aus dem Gebärmutterhals entnommen. Ziel des Eingriffs ist es, die Transformationszone zu erfassen, die als Entstehungsort für Vorstufen als auch für das Zervixkarzinom selbst gilt [123].

Durch die Möglichkeit der postoperativen histologischen Aufarbeitung kann hierbei der Resektionsrand beurteilt oder auch ein okkultes Zervixkarzinom erkannt werden [122].

Obligate Indikationen für exzisionale Methoden sind der Verdacht auf ein invasives oder okkultes Zervixkarzinom, Patientinnen mit ungenügender kolposkopischer Beurteilung, positiver endozervikaler Kürettage und Patientinnen mit einem Rezidiv im Zustand nach einer ablativen Methode.

Die Schlingenkonisation, genannt Loop Electrosurgical Excision Procedure (LEEP) oder Large loop excision of the transformation zone (LLETZ), ist die gängigste operative Methode, da sowohl therapeutisch als auch diagnostisch gehandelt werden kann [124]. Sie gilt als eine Methode, die sicher und effektiv das HP-Virus eliminiert [125]. Weitere Vorteile der Schlingenkonisation sind im Vergleich zu den anderen exzisionalen Methoden die verkürzte Operationsdauer und der geringe Blutverlust [126].

### c) weitere operative Maßnahmen

Eine endozervikale Abrasio wird zur Beurteilung des Zervikalkanals durchgeführt.

#### **1.1.5.3 Nachsorge und Prognose**

Seit 1980 sind die durch Zervixkarzinome verursachten Sterberaten deutlich zurückgegangen. Jährlich sterben in Deutschland circa 1.600 Frauen an Gebärmutterhalskrebs [8].

Patientinnen mit einem invasiven Zervixkarzinom haben eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von circa 69 Prozent [8].

Das Risiko, ein Zervixkarzinom nach der Therapie einer CIN zu entwickeln, ist niedrig verglichen mit unbehandelten Frauen, aber signifikant höher verglichen mit der Allgemeinbevölkerung. Frauen, die bereits eine Behandlung aufgrund einer CIN 3 hatten, haben ein zwei- bis dreifach höheres Risiko daran zu versterben. Das Risiko erhöht sich mit zunehmendem Alter (> 50 Jahre) und einer langjährigen Behandlung (>25 Jahre) [127, 128].

Patientinnen mit einer anamnestischen CIN 3 haben ein erhöhtes Risiko nach ihrem 50. Lebensjahr ein Vulvakarzinom zu entwickeln [129].

Ein negativer HPV-Test wird als Beleg für eine erfolgreiche Behandlung gesehen und schließt eine CIN-Persistenz oder ein Rezidiv mit hoher Wahrscheinlichkeit aus [130–132]. Der negative prädiktive Wert für einen negativen HPV-Test nach einer Konisation liegt zwischen 92- 100% [133, 134] .

#### In-sano-Resektion

Nach der Konisation sollte 6 und 12 Monate postoperativ ein HPV-Test mit einem zytologischen Abstrich erfolgen. Bei negativen Testergebnissen wird die Patientin in Rahmen der generellen gynäkologischen Vorsorgeuntersuchung kontrolliert. Wenn ein Test positiv ausfällt, wird eine Kolposkopie empfohlen [135].

#### Non-in-sano-Resektion

In 25 % der Fälle fallen in der histopathologischen postoperativen Befundung positive Resektionsränder, also eine non-in-sano Resektion, auf [136].

Frauen mit Kinderwunsch erhalten in der Regel keine sofortige Rekonisation [137].

Die Kontrolluntersuchungen nach 6 Monaten beinhalten einen zytologischen Abstrich und eine Kolposkopie. Lässt sich hierbei eine hochgradige CIN nachweisen, ist die Rekonisation indiziert. Die Patientin gilt als geheilt bei drei aufeinanderfolgenden unauffälligen Befunden. Die endozervikale Kürettage wird bei Verdacht auf Läsionen der Endozervix durchgeführt. Nur in Ausnahmefällen kann eine Hysterektomie notwendig sein [138].

#### **1.1.5.4 Komplikationen**

##### **1.1.5.4.1 Komplikationen postoperativ**

Zu den häufigsten Komplikation nach einer Konisation zählen Blutungen, Infektionen und die Zervixstenose [139].

##### **1.1.5.4.2 Komplikationen in der Schwangerschaft**

In vielen Studien wurde die enge Korrelation zwischen der entfernten Konusgröße und dem Risiko einer Frühgeburt nachgewiesen. Ab einem Konusvolumen von 2,66 cm<sup>3</sup> verdoppelt sich das Risiko eine Frühgeburt nach einer Konisation zu erleiden. Kein Zusammenhang wurde zwischen dem Schweregrad einer CIN mit dem Risiko der Frühgeburtlichkeit gefunden [140–142].

Jin et al. beobachteten, dass ein LEEP-Eingriff mit einer Verkürzung der Zervix < 3cm assoziiert ist und somit die Wahrscheinlichkeit für eine Frühgeburt erhöht ist [124].

Noehr et al. wiesen nach, dass das Risiko einer Frühgeburtlichkeit mit der Tiefe des exzidierten Konus steigt. Außerdem erhöht sich das Risiko für eine Frühgeburtlichkeit um das 4-fache wenn mehr als zwei LEEPs und um das Doppelte wenn eine LEEP vor der Geburt anamnestisch eruiert wurde [143].

Vor allem exzisionale Methoden scheinen ungünstige schwangerschaftsassozierte Resultate hinsichtlich der perinatalen Mortalität, der Frühgeburtlichkeit und einem niedrigen Geburtsgewicht hervorzurufen [141, 144–146].

Insbesondere Frauen vor der 28. Schwangerschaftswoche haben nach einer Konisation in der Vorgeschichte ein erhöhtes Risiko eine Frühgeburt zu erleiden [147].

In einer Studie von Bjorge et al. wurde auch ein erhöhtes Risiko von Spontanaborten und Stillgeburten bei Frauen, die bereits eine Behandlung mit Laserkonisation und LEEP aufwiesen, festgestellt [148].

Als mögliche Gründe für das erhöhte Frühgeburtlichkeitsrisiko werden immunmodulatorische Mechanismen infolge der HPV-Infektion, die Entfernung von zervikalen Gewebe durch eine Konisation der Cervix uteri und der bakterielle Zugang durch das beeinträchtigte antimikrobielle Milieu angenommen [146, 149].

#### 1.1.5.4.3 Viruspersistenz und Entwicklung zum invasiven Zervixkarzinom

In den meisten Fällen ist das Virus nach der Operation eradiziert [136]. Da es trotz einer Behandlung zu einem Rezidiv kommen kann, stellt der HPV-Test nach einer Konisation einen wichtigen Prognosefaktor dar [133, 134, 150, 151]. Vor allem die Persistenz mit den HPV-Subtypen 16, 18, 31 und 45 ist eng mit dem Risiko einer Invasion verknüpft, da diese HPV-Subtypen in 80% der Zervixkarzinome nachweisbar sind [32, 46, 48].

	Rückbildung (%)	Persistenz (%)	Progression zum Carcinoma in situ (%)	Progression zum invasivem Karzinom (%)
<b>CIN I</b>	57	32	11	1
<b>CIN II</b>	43	35	22	5
<b>CIN III</b>	32	56	Keine Angabe	12

**Tabelle 1.4 Progressions-, Regressions- und Persistenzraten [152]**

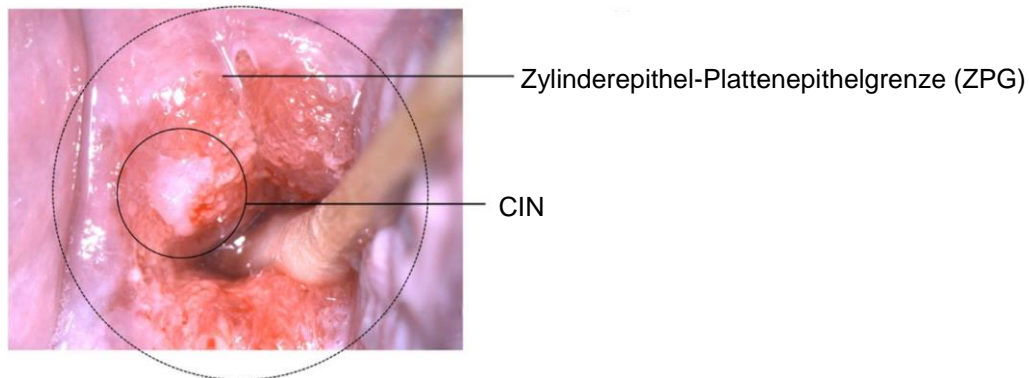
Das Risiko einer Persistenz der CIN nach einer Konisation korreliert mit dem Schweregrad der Läsion, dem Alter der Patientin, der Größe der Läsion und der Lokalisation. In den meisten Fällen ist trotz einer primären non-in-sano-Resektion in einer direkt folgenden Nachkonisation bereits keine Dysplasie mehr nachzuweisen. Stellt sich am Absetzungsrand histologisch eine CIN I dar, beträgt das Risiko ein Rezidiv zu erleiden nur 0 bis 5 %, wohingegen eine CIN III ein Rezidiv-Risiko von 20 bis 25% bedeutet. Mit einer Viruspersistenz ist in 30% der Fälle bei einem endozervikalen Befall zu rechnen. Ist sowohl endozervikal und vaginal eine CIN III histologisch gesichert worden, erhöht sich das Risiko der Viruspersistenz auf bis zu 50% [136].

Ältere Frauen haben ein höheres Risiko nach der Behandlung einer CIN 3 ein Rezidiv zu erleiden als jüngere Frauen, unter anderem da die Präkanzerose häufiger endozervikal liegt [127].

Eine Persistenz ist entweder auf mikroskopisch kleine, nicht gänzlich entfernte Läsionen zurückzuführen oder die Cervix ist immer noch dem onkogenem Verursacher ausgesetzt [134].

Eine persistierende Infektion mit HPV-Hochrisikotypen, die länger als 6 Monate besteht, ist fast immer mit der Entwicklung zu hochgradigen Dysplasien der Zervix und der Entstehung eines Zervixkarzinoms verbunden [4, 36, 150, 153].

Strander et al. beschrieb in einer schwedischen Studie, dass eine gewebesparende Konisation zwar die Risiken, zum Beispiel einer Frühgeburt, verringern könnte, aber die onkologische Sicherheit jedoch eventuell nicht gewährleistet ist. Eine weniger operative Radikalität wurde mit einem erhöhten Auftreten von einem Zervix- oder Vaginalkarzinom assoziiert [128, 154].



**Abbildung 1.4 Darstellung einer dysplastischen Läsion der Cervix uteri mit Einzeichnung der Zylinderepithel-Plattenepithelgrenze (ZPG) [155]**

## **2 Zielsetzung**

Die zervikale intraepitheliale Neoplasie gilt als Vorstufe des Zervixkarzinoms und entwickelt sich hauptsächlich aufgrund einer persistierenden Infektion mit high-risk-HPV-Typen. Eine hochgradige Dysplasie wird operativ im Rahmen einer Konisation therapiert. Eine der schwerwiegendsten Komplikationen der Operation ist die Erhöhung des Frühgeburtlichkeitsrisikos. Dieses korreliert unmittelbar mit der Größe des entfernten Konus. Laut Definition wird bei der LLETZ die Läsion inklusive der Transformationszone entfernt. Aufgrund des Risikos einer Frühgeburt stellt sich die Frage, ob die Entfernung ausschließlich der Läsion ohne Resektion der Transformationszone der klassischen Konisation onkologisch gleichwertig ist.

Ziel der vorliegenden prospektiven Studie war es daher, die klassische Hochfrequenzschlingenkonisation (= Resektion der Läsion unter Mitnahme der kompletten Transformationszone) der gezielten Resektion lediglich der kolposkopisch auffälligen Läsion gegenüberzustellen und hinsichtlich onkologischer Sicherheit zu vergleichen. Als Surrogatparameter wurde die Rate an positiven high-risk-HPV-Tests 6 Monate postoperativ als primäres Zielkriterium verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollen folgende Aspekte untersucht werden:

- Gleichbleibende onkologische Sicherheit trotz Reduktion der OP-Radikalität
- Typisierung und Quantifizierung der für ein Karzinom verantwortlichen HPV-Subtypen
- Vergleich der beiden Operationstechniken hinsichtlich des HPV-Status, dem zytologischen und histologischen Befundes zu definierten Untersuchungszeitpunkten (präoperativ, intraoperativ, 6 und 12 Monate postoperativ)
- Nachweis des onkogenen Potentials der high-risk-HPV-Typen durch molekularbiologische Untersuchungen
- Vergleich der beiden Operationstechniken hinsichtlich der intra- und postoperativen Prävalenz von high-risk-HPV-DNA und E6/E7 mRNA



---

Mit der vorliegenden Studie soll eine Operationstechnik etabliert werden, die im Vergleich zur klassischen LLETZ

- die Frühgeburtsrate bzw. das Risiko an Fehlgeburten bei Frauen im reproduktiven Alter senken könnte
- möglichst gewebesparend ist, um weniger postoperative Komplikationen zu verursachen (Zervixinsuffizienz, Blutungen, Infektionen)
- eine gleichwertige onkologische Sicherheit aufweist

### **3 Patientinnen, Material und Methoden**

#### **3.1 Patientinnen**

##### **3.1.1 Fallzahlschätzung**

Pro Gruppe wurde eine Fallzahl von 446 Patientinnen ( $\alpha=0.05$ , Power=80%, non-inferiority margin=5%) vorgesehen. Mit der Einbeziehung von 10% drop-out Fällen sollten aufgerundet insgesamt 1000 Patientinnen in die Studie einbezogen werden.

Die molekularbiologischen Untersuchungen sollten bei einer Subgruppe von 250 der 1000 Patientinnen erfolgen.

##### **3.1.2 Aufnahmekriterien**

###### Einschlusskriterien:

- Patientinnen mit (intern oder extern) histologisch gesicherter CIN III und positivem high-risk-HPV-Test
- ohne vorherige Operation im Bereich der Zervix uteri
- Typ 1 oder 2 Transformationszone mit kolposkopisch sichtbarer Läsion
- bisher keine Therapie der Erkrankung
- Alter > 18 Jahre
- prämenopausal
- schriftliches Einverständnis

###### Ausschlusskriterien:

- Jederzeit auf Wunsch der Patientin
- Schwangerschaft der Patientin bei Einschluss, sowie während der ersten 6 postoperativen Monate
- vorausgegangene HPV-Impfung
- Einnahme von Immunsuppressiva (inklusive Glukokortikoide)
- bekannte HIV-Erkrankung
- behandlungsbedürftige maligne Erkrankung
- Typ 3 Transformationszone

### **3.1.3 Untersuchungsablauf und Probengewinnung für molekularbiologische Untersuchungen**

#### **3.1.3.1 Untersuchungsablauf**

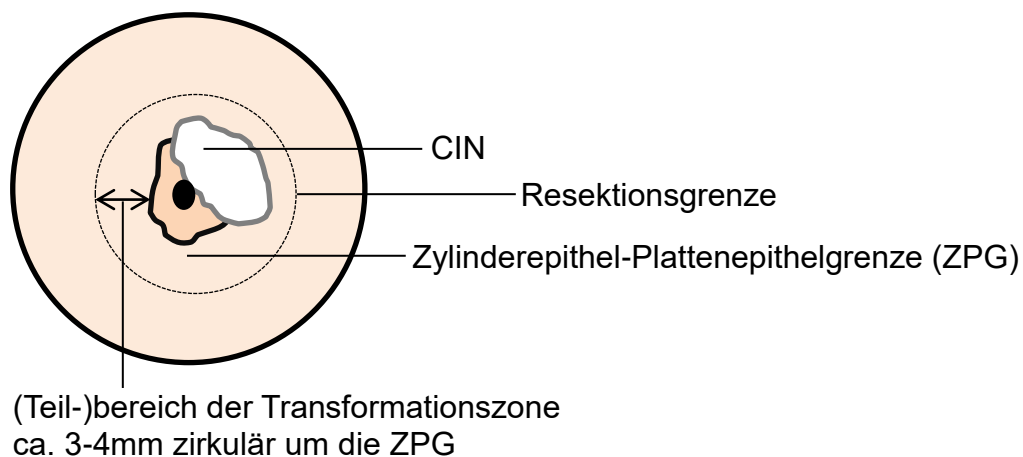
Insgesamt wurden 4 Besuche vorgesehen.

##### Besuch 1 (präoperativ):

- Indikationsstellung zur Konisation unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien
- Erhebung des HPV-Status, der Zytologie, der Histologie und des Kolposkopie-Befundes
- Reguläre OP-Aufklärung und Studienaufklärung
- Randomisierung
- Pseudonymisierung der Patientin

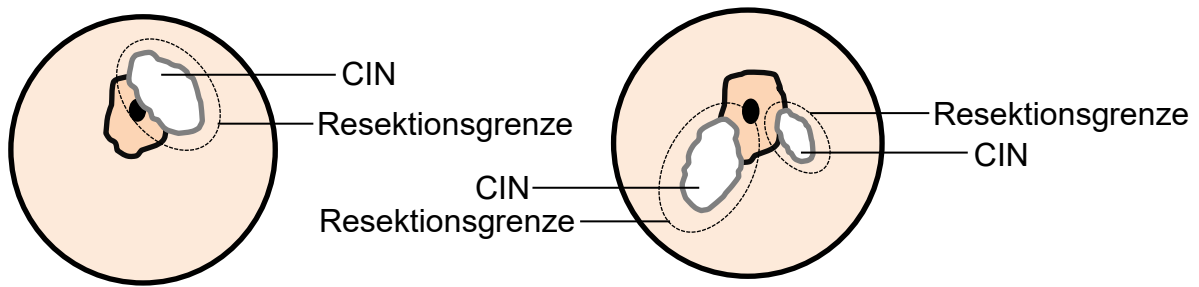
##### Besuch 2 (Operation):

- Die Operation erfolgte entsprechend der randomisierten Zuteilung in die beiden Operationsmethoden:
  - Klassische LLETZ: Resektion der Zylinder-Plattenepithelgrenze mit einem Sicherheitsabstand von 3-4 mm inklusive Entfernung der Läsion mit einem Sicherheitsabstand von 2 mm



**Abbildung 3.1 Darstellung der Resektionsgrenzen bei der Konisation nach LLETZ [155]**

- Isolierte Resektion der kolposkopisch sichtbaren Läsion:  
Entfernung der Läsion mit einem Sicherheitsabstand von 2 mm



**Abbildung 3.2 Darstellung der Resektionsgrenzen bei der modifizierten Konisation [155]**

- Foto oder Skizze der durchgeführten Operation
- Ermittlung der Konusgröße nach dem Archimedes Prinzip
- Beurteilung des Dysplasiegrades und der Resektionsränder durch den Pathologen analog der S3-Leitlinie

Besuch 3 (6 Monate postoperativ):

- Entblindung der Patientin
- Erhebung von Zytologie, HPV-Test, Kolposkopie, ggf. Biopsie bei Auffälligkeiten

Besuch 4 (12 Monate postoperativ):

- Erhebung von Zytologie, HPV-Test, Kolposkopie, ggf. Biopsie bei Auffälligkeiten

Das primäre Zielkriterium dieser Studie war ein negativer high-risk-HPV-Test 6 Monate postoperativ, da der fehlende Nachweis von HPV als sogenannter „test of cure“ gewertet wird.

Eine weitere klinische Kontrolle erhielten die Patientinnen 12 Monate postoperativ. Eine Rekonisation wurde bei Rezidiv oder Persistenz der CIN analog den Empfehlungen der Leitlinie durchgeführt.

Die postoperativen Untersuchungen unterschieden sich nicht von der üblichen Nachsorge.

### **3.1.3.2 Probengewinnung für molekularbiologische Untersuchungen**

An den Zentren der LMU München sowie der Hochschule Hannover wurden zum Zeitpunkt der OP sowie im Rahmen der beiden postoperativen Visiten Abstriche entnommen und zur Genotypisierung an die Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin; Gynäkologische Tumorummunologie; z.Hd. Herr PD Dr. Andreas M. Kaufmann verschickt.

Als Probenahme- und Transportmedium diente die PreservCyt® Lösung (ThinPrep® Pap Test, Hologic, Inc., USA), welche zwischen 15°C und 30°C gelagert und versandt wurde.

Nach der Genotypisierung an der Charité Berlin wurden Aliquots mit je 5 ml Probenvolumen in das Labor von Herrn Prof. Dr. med. Karl Sotlar des Pathologischen Instituts der LMU geschickt. Die Probe wurde bei 4-8 °C im Eingangslabor gelagert.

Da das onkogene Potential der high-risk-HPV-Typen auf der Interaktion der Onkoproteine E6 und E7 mit den Tumorsuppressorproteinen p53 und pRb beruht und somit auch eine Aussage über die biologische Aktivität der Infektion getroffen werden kann, ermöglichen die genannten molekularbiologischen Zusatzuntersuchungen eine genauere Aussage hinsichtlich der onkologischen Sicherheit der beiden Operationsmethoden.

### 3.2 Material und Methoden

Alle experimentellen Arbeiten wurden im Labor der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Sotlar im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, sowie im Labor von Herrn PD Dr. med. A.M. Kaufmann, Leiter der gynäkologischen Tumorimmunologie der Charité, Campus Benjamin Franklin in Berlin durchgeführt.

#### 3.2.1 Material

##### 3.2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysewaage	KB 1000-2	Kern, D
Eismaschine	SPR 80	Nord Cap, D
Elektrophoresekammer	Model 40-1410	Peq Lab Biotechnologie, D
Elektrophoresenetzgerät	Model 200/2.0 Power Supply	Bio Rad, USA
Gefrierschrank -80°C		Thermo Fisher Scientific, USA
Gefrierschrank -20°C		Liebherr, D
Kamerasystem	Multimage Light Cabinet Filter Positions	Alpha Innotech, USA
Mikrowelle		Miele, D
Photometer	Colibri	Titertek-Berthold, D
Thermo-Cycler	Veriti 96 well	Applied Biosystems, USA
Tischzentrifuge	C-1200	National Labnet Co., USA
Trockenblock Heizgerät	TS-100 Thermo Shaker	Kisker Biotech, D
Zentrifuge	5415 R	Eppendorf, D
Zentrifuge	IEC Centra CL3R	Thermo IEC, USA
Vakuumzentrifuge	DNA Speed Vac® 110 Savant	Thermo Scientific, D
Vortexer	Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, CH

##### 3.2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien

Einwegpipetten
Erlenmeyer-Kolben
Falcon-Röhrchen
Laborhandschuhe
Nucleasefreie Reaktionsgefäße
Pipetten
Pipettenspitzen 5µl, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl

### 3.2.1.3 DNA-Extraktion

Qiamp DNA Minikit	Cat. No: 51306 Qiagen
Abs.Ethanol	Merck
Aerosol-resistente Filtertips	Greiner Bioone
DNA-Away	Roth
Protrap 295PE Papier	Schleicher&Schuell

#### a) Oligonukleotidsonden für die HPV Genotypisierung von GP5+/6+-PCR Produkten

HPV Typ oder Name der Probe <sup>a</sup>	Quelle <sup>b</sup>	Zugangs- Nummer <sup>c</sup>	Proben Sequenz (5-3)	Länge
6	dV	X00203	TCC GTA ACT ACA TCT TCC A	19-mer
11	dV	M14119	TCT GTG TCT AAA TCT GCT AC	20-mer
16 <sub>d</sub>	dV	K02718	TAC CTA CGA CAT GGG GAG	18-mer
18	dV	X05015	TGC TTC TAC ACA GTC TCC T	19-mer
31	AL	J04353	GCA ATT GCA AAC AGT GAT AC	20-mer
33	GO	M12732	TGC ACA CAA GTA ACT AGT GA	20-mer
35	AL	M74117	CTG CTG TGT CTT CTA GTG A	19-mer
39 <sub>d</sub>	GO	M62849	TAC ATT ATC TAC CTC TAT AGA	21-mer
42 <sub>d</sub>	GO	M73236	GCC ACT GCA ACA TCT GGT G	19-mer
43	AL	AJ620205	TCT ACT GAC CCT ACT GTG	18-mer
44	AL	U31788	TAC TAG TGA ACA ATA TAA GCA	21-mer
45	GO	X74479	TAA TTT AAC ATT ATG TGC CTC	18-mer
51	dV	M62877	TGC TGC GGT TTC CCC AA	17-mer
52	WL	X74481	GAA TAC CTT CGT CAT GGC	18-mer
56 <sub>d</sub>	AL	X74483	GAT GCA CGA AAA ATT AAT CAG	21-mer
58	TM	D90400	TAT GCA CTG AAG TAA CTA AG	20-mer
59 <sub>d</sub>	TM	X77858	AGA ATA TGC CAG ACA TGT G	19-mer
66 <sub>d</sub>	GO	U31794	CGT GAA ATC AAT CAA TAC CTT C	22-mer
68	GO	AJ831568	CTG AAT CAG CTG TAC CAA A	19-mer
70 <sub>d</sub>	GO	U22461	TTT ACA TTG TCT GCC TGC A	19-mer
73 <sub>d</sub>	dV	NC_006165	GTA TGC CAA CTC WAA TTT TAA <sub>e</sub>	21-mer
82 <sub>d</sub>	TM	AB027021	ACT CCA RCA AAC TTT AAG CAG T <sub>f</sub>	22-mer
Universal <sub>d</sub>			GiC ATG iiG ARG AAT ATG A <sub>g</sub>	19-mer

a. [156]

b. Plasmid DNA wurde zur Verfügung gestellt von dV (E.-M. de Villiers; DKFZ, Heidelberg, Germany), GO (G. Orth; Institut Pasteur, Paris, France), AL (A. Lořincz; Digene Corp., Gaithersburg, MD), TM (T. Matsukura; National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan), und WL (W. Lancaster; Wayne State University, Detroit, MI).

c. Sequenz wurde als Referenz für den dazugehörigen HPV Genotypen genutzt

d. Geänderte Proben

e. W, A/T.

f. R, A/G.

g. i, Inosin.

**b) BSGP5+/6+ Primer Sequenzen**

<b>Primer <sub>a</sub></b>	<b>Richtung <sub>b</sub></b>	<b>Sequenz <sub>c</sub> (5' zu 3')</b>
β-Globin		
MS3	F	AAT ATA TGT GTG CTT ATT TG
Bio-MS10	R	AGA TTA GGG AAA GTA TTA GA
HPV		
GP5+	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC
BSGP5+-2	F	TTT GTT ACT GTT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-3	F	TTT GTT ACT GTT GTI GAT ACC AC
BSGP5+-4	F	TTT GTT ACT TGT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-5	F	TTT TTA ACT GTT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-6	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAC ACT AC
BSGP5+-7	F	TTT GTT ACA GTI GTA GAC ACT AC
BSGP5+-8	F	TTT GTT ACA GTI GTA GAT ACC AC
BSGP5+-9	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACC AC
Bio-GP6+	R	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C
Bio-BSGP6+-b	R	GAA AAA TAA ATT GTA AAT CAT ACT C
Bio-BSGP6+-c	R	GAA AAA TAA ATT GCA ATT CAT ATT C

- a. Bio-, biotinyliert.  
b. F=forward; R=reverse.  
c. β-Globin Primer sind 20 Nukleotide, BSGP5+/6+ forward Primer sind 23 Nukleotide, und BSGP5+/6+ backward Primer sind 25 Nukleotide in Länge. I=Inosin.

**3.2.1.4 HPV-Genotypisierung-Reagenzien**

Bioplex™ COOH-Beads	Bio Rad, USA
Hybridisierungspuffer	0,15 M TMAC (Tetramethylammoniumchlorid) 75 mM Tris-HCL, pH 8.0 6 mM EDTA, pH 8.0 1,5 g/L 1-Sarkosyl/N-Lauroylsarcosine (Sigma, USA)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCL, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
Färbepuffer	2 M TMAC 75 mM Tris-HCL, pH 8.0 6 mM EDTA, pH 8.0 1,5 g/L 1-Sarkosyl 1 mg/ml Casein
Blockpuffer-Waschpuffer	PBS 1 mg/ml Casein, pH 7.4±0,1: 0,5g Cas. auf 500 ml PBS
Streptavidin-R-Phycoerythrin	Invitrogen, USA Cat. No S866



### 3.2.1.5 RNA-Extraktion

Trizol® Reagent	Invitrogen life technologies, USA Cat.No. 15596-026
Chloroform	Sigma-Aldrich, USA C2432-25ML
Isopropanol	Sigma-Aldrich, USA I9516 - 25ML
75% Ethanol in Diethyl pyrocarbonate (DEPC) Water	Sigma D5758-100ML, D

### 3.2.1.6 cDNA-Synthese

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, CH REF: 04 896 866 001
1) Transcriptor Reverse Transcriptase 1000 U (20 U/µl) 2) Transcriptor RT Reaction Buffer 3) Protector RNase Inhibitor 4000 U 4) Deoxynucleotide Mix 10 mM 5) Random Hexamer Primer 600 µM	

### 3.2.1.7 Amplifikation der spezifischen HPV-Onkogene E6/E7 mittels Nested PCR

#### a) Sequenz und Position der PCR-Primer

HPV	Forward Primer (5'-3')	Position (nt)	Reverse Primer (5'-3')	Position (nt)
16	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC	141-161	TCC TCC TCC TCT GAG CTG TC	668-649
18	GCT TTG AGG ATC CAA CAC GG	112-131	CTG AGT CGC TTA ATT GCT CG	692-673
31	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G	137-158	TCC TCC TCA TCT GAG CTG TC	666-647
33	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	172-192	TCA TCC TCA TCT GAG CTG TC	679-660
35	CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C	157-178	TCC TCC TCC TCT GAG CTG TC	668-649
39	GCC AGA CCT GTG CAC AAC GC	148-167	CTG ACT CTC CTA ATT GCT CG	697-678
45	CAC TAC AAG ACG TAT CTA TTG	172-192	CTG ACT CGC TTA ATT GCT CG	692-673
51	ACC ATG TTC GAA GAC AAG AG	94-113	TCC TCC TCC TCT GAG CTG TC	666-647
52	GTG AGG TGC TGG AAG AAT CG	148-167	TCC TCC TCA TCT GAG CTG TC	659-640
56	GCA GCT TAT TCT GTG TGG AC	76-95	TCC TCA TCC TCT GAG CTG TC	678-659
58	TGT TCC AGG ACG CAG AGG AG	111-130	TCA TCC TCG TCT GAG CTG TC	680-661
59	TAC ACA ACG ACC ATA CAA ACT G	108-129	TCT CGG AGT CGG AGT CAG G	686-668
66	GCA GCC TGT TGT GCC TGT AG	76-95	TCC TCA TCC TCT GAG CTG TC	678-659
68	GCT ATT TCA CAA CCC TGA GG	109-128	CTG AAT CTC CTA ATT GCT CG	693-674

b) Sequenz der Referenzgen Primer

HPV	Forward Primer (5'-3')	Länge (nt)	Reverse Primer (5'-3')	Länge (nt)	Amplicon (bp)
h-KRT13	CTA CAA GAC CAT TGA GCT AGA GCT CC	23	CAT GGT TCT TCT TCA TGT AGG CT	23	266
h-RPLP0	GGA GAC AAA GTG GGA GCC A	19	AGG ACT CGT TTG TAC CCG TT	20	257

c) Reagenzien

AmpliTaQ Gold® 250 Units, 5 U/μl, 4486226	Applied Biosystems by Life Technologies, USA
dNTP Mix 25mM, #R1122	Thermo Scientific, Litauen
Puffer, 10xPCR Buffer + 15mM MgCl <sub>2</sub> ; 4486218	Applied Biosystems by Life Technologies, USA
RNase free water, 2351744	Braun, D
Taq-Polymerase	Applied Biosystems by Life Technologies, USA

d) Sequenz und Position der nested PCR Primer

HPV	Forward Primer (5'-3')	Position (nt)	Reverse Primer (5'-3')	Position (nt)	Amplicon (bp)	
					DNA	mRNA
16	GTG TGT ACT GCA AGC AAC AG	192-211	CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	597-573	406	224
18	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	170-190	GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	491-470	322	140
31	GGC ATT GGA AAT ACC CTA CG	158-177	GGT TTC AGT ACG AGG TCT TC	548-529	391	189
33	GGA ATG CAA AAA ACC TTT GCA A	201-222	GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	569-549	369	92
35	CAA ACA AGA ATT ACA GCG GA	208-227	GGT CAG TTG CCT CGG GTT C	625-607	418	236
39	GAC GAC CAC TAC AGC AAA CC	213-232	CTT TGG TCC ACG CAT ATC TG	606-587	394	212
45	GCA AAG CAA CAT TGG AAC GC	205-224	GGG TCC ATG CAT ACT TAT TGC	598-587	394	212
51	AAG ACC ACG AAC GCT GCA TG	117-136	TCA GTC TGT GGT GTT AAA TGC	618-598	502	278
52	GTG CAT GAA ATA AGG CTG CAG	168-188	GTC AGT TGT TTC AGG TTG CAG	615-595	448	171
56	ATG GAG CCA CAA TTC AAC AAT C	102-123	GAT TCT CTA GGT TCT CTA GAT G	559-538	458	204
58	GTT GGA GAC ATC TGT GCA TG	163-182	GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	570-550	408	131
59	CTC TGC ATG ATA TTC GCA TC	158-177	CAC ACA AGG TCA ACT TCC TC	654-635	497	99
66	CCT GTA GAT ATC CAT GGA TTC C	89-110	AGA TTC TGT AGC TTG TCT ACT C	560-539	472	218
68	GCA GAA GGC AAC TAC AAC GG	207-226	GCT TTG GTC CAT GCA TAG TTA G	603-582	397	215

### 3.2.1.8 Gelelektrophorese

Agarose peqGOLD Universal 208153	Peq Lab Biotechnologie, D
Aqua dest.	Kerndl Aqua Bideest, D
Ethidiumbromid 2218.2	Roth, D
Leiter peqGOLD DNA Sizer XIII 25-2171	Peq Lab Biotechnologie, D
Loading-Dye, Blue loading Buffer 6x, 5ml; 25-2171	Peq Lab Biotechnologie, D
RNase Free Water, 1012888	Qiagen, D
Tris Borate EDTA buffer 10x concentrate, T4415-4L	Sigma Life Science, USA

### 3.2.1.9 Software

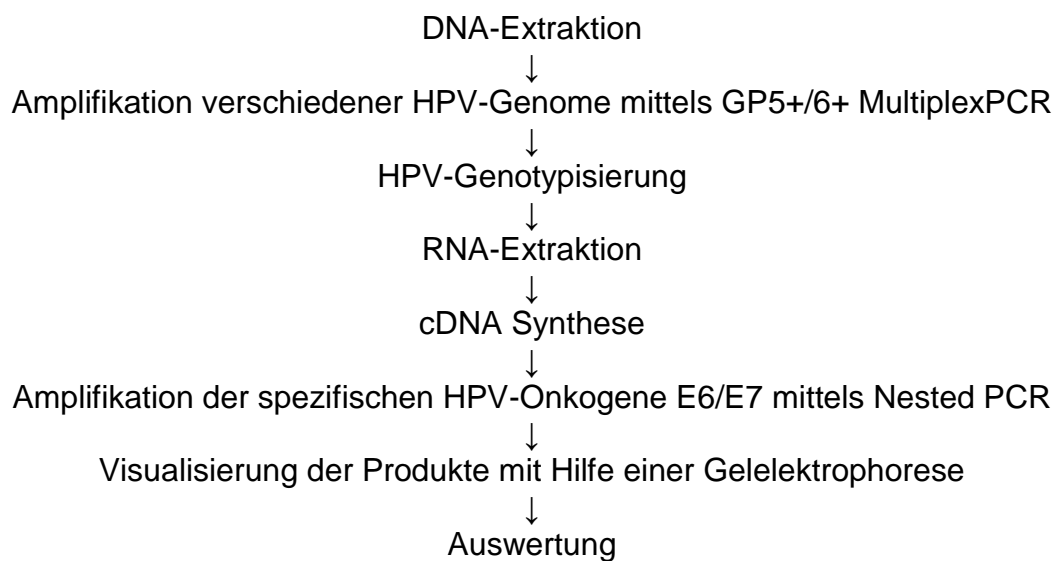
Adobe Reader XI
Citavi 5
Cycler Software
Fluor Chem FC2
Microsoft Office 2010, 2016
Randoulette 3.1, LMU

## 3.2.2 Methoden

### 3.2.2.1 Überblick

Wie bereits erwähnt, wurden im Rahmen der Operation und bei den postoperativen Kontrolluntersuchungen jeweils Abstriche entnommen.

Folgende Untersuchungen werden mit den Abstrichen durchgeführt:



### **3.2.2.2 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit von Qiagen durchgeführt.

#### Vorbereitung:

Nach Herstellerangaben wurde zu Puffer AW 1 einmalig 125 ml 100% Ethanol und zu Puffer AW 2 einmalig 160 ml Ethanol zugegeben.

Ein Heizblock wurde auf 56°C erhitzt und ein frisches Polytrap 295PE Papier wurde untergelegt.

#### Durchführung:

200 µl der Abstrichprobe wurden in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl AL Puffer und 20 µl Proteinase K gegeben und anschließend gevortext, danach 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Daraufhin wurde zu dem Gemisch 200 µl Ethanol gegeben und die Lösung gut gemischt. Die Lösung wurde auf die Säule aufgetragen und eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde anschließend verworfen und durch ein Neues ersetzt. Nach Zugabe von 500 µl des Waschpuffers 1 wurde eine weitere Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde das Sammelröhrchen verworfen und nach Zugabe von 500 µl des Waschpuffers 2 eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm wurde der Filter getrocknet. Nach Zugabe von 80 µl AE-Puffer und einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur lag durch erneutes Zentrifugieren von einer Minute bei 8000 rpm die DNA gelöst im Reaktionsgefäß vor.

Je 5 µl DNA-Matrize wurden von den DNA-Eluaten für die GP5+/6+ PCR eingesetzt.

### **3.2.2.3 HPV-Genotypisierung**

Die HPV-Typisierung basierte auf einem Hybridisierungs-Verfahren, mit dem 27 verschiedene high- und low-risk-HPV-Typen nachgewiesen werden können. Zu den identifizierbaren low-risk-HPV-Typen gehören: 6, 11, 42, 43, 54, 57, 70, 72, 90. Bei den Hochrisikogruppen sind folgende HPV-Typen nachweisbar: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 und 82. Die HPV-

Typisierung mit Hilfe der Luminex-Technologie orientierte sich an den Assays von Schmitt et al. 2006 und 2008 [157, 158].

Zuerst erfolgte die Amplifikation der verschiedenen HPV-Genome aus den Zervix-Abstrichen mittels einer PCR. Als Negativkontrolle wurde parallel eine  $\beta$ -Globin spezifische PCR durchgeführt:

PCR-Programm:

- |           |                        |                            |
|-----------|------------------------|----------------------------|
| 1. Phase: | 4 min bei 94°C         | → initiale Denaturierung   |
| 2. Phase: | 20 sec bei 94°C        | → Denaturierung            |
|           | 30 sec bei 38°C        | → Annealing                |
|           | 80 sec bei 71°C        | → Elongation               |
|           | → zu jeweils 40 Zyklen |                            |
| 3. Phase: | 4 min bei 71°C         | → abschließende Elongation |

Zu 10  $\mu$ l PCR-Produkt aus der GP5+/6+ PCR wurden 7  $\mu$ l TE-Puffer pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert und anschließend 33  $\mu$ l Bead-Mix dazugegeben. Der Bead-Mix besteht aus einem Hybridisierungspuffer und HPV-typspezifischen Fluoreszenz-Oligonukleotidsonden, die mit Polystyrol-Kügelchen (=Beads) gebunden sind. Das Gemisch in den Wells der 96-Well-Platte wurde nun 10 Min bei 95°C erhitzt, um die darin enthaltene doppelsträngige DNA zu denaturieren.

Hinterher wurden die HPV-typspezifischen Fluoreszenz-Oligonukleotidsonden für 35 min bei 41°C an die jetzt einzelsträngige DNA hybridisiert. Nach einmaligen Waschen mit 100  $\mu$ l Waschpuffer pro Well wurde Streptavidin, das zur Fixierung der mit den Beads gebundenen hybridisierten DNA-Fragmente dient, 1:1600 mit einem Färbepuffer verdünnt und dann zu je 75  $\mu$ l in eine Well gegeben. In der Folge eines 25-40 min Inkubationsschrittes auf einem horizontalen Schüttler wurde jedes Well abermals mit 100  $\mu$ l Waschpuffer 2x gewaschen, um im Nachhinein die Fluoreszenzsignale am Biorad-Luminexgerät photometrisch auswerten zu können.

Die Abfolge einzelner Fluorochrome je Sonde ermöglicht es dem Gerät insgesamt 27 spezifische HPV-Subtypen zu detektieren.

Nach der Typisierung wurden die Ergebnisse und die Proben in das Pathologische Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München geschickt.

### **3.2.2.4 RNA Extraktion**

#### **3.2.2.4.1 Prinzip**

Durch die Gewinnung von reiner und intakter RNA aus den Gewebeproben können molekularbiologische Untersuchungen der Genexpression durchgeführt werden.

Durch den Vorgang der Homogenisierung werden die Nukleinsäuren und Proteine sowie weitere intrazelluläre Bestandteile zugänglich gemacht.

Trizol<sup>®</sup> ist eine monophasische Mischung aus Guanidinisothiocyanat und Phenol und dient dazu, Zellen und Gewebe direkt zu lysieren und gleichzeitig RNA zu stabilisieren, indem sie vor abbauenden RNasen geschützt wird.

Chloroform denaturiert und präzipitiert Proteine. Außerdem kommt es nach Zugabe von Chloroform zur Auftrennung des monophasigen Trizols in drei Dichte-bedingte Phasen. Die RNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase, während Proteine und DNA in der intermediären, organischen Phase vorliegen und die reine DNA in der unteren, rosagefärbten Phase verbleibt. Die RNA kann nun selektiv von der DNA abpipettiert werden.

Um die RNA zu fällen, wird Isopropanol zugegeben.

Die Konzentration von wässrigen RNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Absorption von 260 nm ermittelt. Die Reinheit und Qualität der RNA wurde anhand des A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>-Quotienten eingeschätzt und ermöglicht eine Aussage über eventuelle Kontaminationen der RNA mit DNA, bzw. mit Mikrofremdpartikeln. Eine Ratio von 1,7 - 2,3 spricht für eine reine Ribonukleinsäurelösung.

### **3.2.2.4.2 Durchführung**

Da die als Einzelstrang vorliegende RNA sehr anfällig gegenüber abbauenden RNasen ist und leicht degradiert, mussten gesonderte RNase freie Lösungen und Reaktionsgefäße verwendet werden.

In allen folgenden Versuchsreihen wurden die Proben auf Eis gelegt.

Die Gewebeproben wurden 5 min zentrifugiert, damit sich das Zell-Gewebe als Pellet im 15 ml Falcon-Röhrchen anlegt und somit durch Dekantieren vom Transportmedium getrennt werden konnte.

#### a) Homogenisierung/ Phasentrennung

Nach Hinzugabe von 1ml Trizol wurden die Zellen durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren lysiert. Danach folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur um die Zellen zu homogenisieren.

Hinzu kamen 200 µl Chloroform, die Mixtur wurde 15 Sekunden durchmischt und anschließend 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem für 15 min bei 4°C und 12000g zentrifugiert worden ist, lagen die gelösten Zellkomponenten in den wie oben genannten Phasen vor.

Die wässrige und farblose obere Phase enthält die RNA, die in ein steriles, gefrierfestes Tube überführt wurde, ohne dabei die proteinhaltige Interphase zu tangieren. Die untere rötliche Phase, in der DNA enthalten ist, und die Interphase wurden verworfen.

#### b) RNA Ausfällung

Zu der isolierten RNA wurden 500 µl Isopropanol gegeben und nach kurzem Vortexen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 10 min Zentrifugieren bei 4°C und 12000g, formt die RNA ein Pellet am Boden des Tubes.

Der komplette Überstand wurde entfernt und 1ml 75% Ethanol in das Tube pipettiert. Nach erneutem Vortexen wurde die Probe 5 min bei 4°C und 7500g zentrifugiert. Nachdem der Alkohol wieder entfernt worden ist, wurden die Proben 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und mit offenen Deckeln in der Vakuumzentrifuge zentrifugiert, um ein Verdampfen des Restalkohols zu

erreichen. Mit 30 µl RNase freiem Wasser wurde die RNA während der Inkubation bei 55-60°C für 10 Min gelöst.

#### c) Bestimmung der RNA Konzentration

Eine Eichung des Photometers mit RNase freien Wasser wurde vor der ersten Messung durchgeführt.

Von jeder RNA Probe wurden 1,2 µl zur photometrischen Konzentrationsmessung verwendet. Damit in den folgenden Experimenten von jeder Probe die möglichst gleiche Menge RNA eingesetzt wurde, ist die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration eine entscheidende Messung.

Für alle weiteren Experimente wurden nur reine Nukleinsäurelösungen verwendet, die gemäß den Qualitätsrichtlinien eine Ratio  $_{260/280nm} = 1,7 - 2,3$  aufwiesen.

Die RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert.

### **3.2.2.5 cDNA Synthese**

#### **3.2.2.5.1 Prinzip**

In diesem Schritt wurde die RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die im Anschluss als Ausgangsmaterial für eine PCR genutzt wurde. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die in E.coli exprimiert wird und bis zu 14 kb lange cDNA Produkte synthetisieren kann.

Als Primer wurde der unspezifisch bindende Random Hexamer Primer verwendet, eine Mischung verschiedener Oligonukleotide aus sechs zusammengesetzten Basenpaaren. Diese lagern sich komplementär an den RNA-Strang an und bilden die Startpunkte für die Reverse Transkriptase.



### 3.2.2.5.2 Durchführung

Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche durchgeführt.

Vor dem Gebrauch wurden alle Reagenzien aufgetaut und kurz anzentrifugiert. Während der Herstellung wurden alle Reagenzien auf Eis gekühlt.

Anhand der zuvor gemessenen RNA Konzentration wurde durch entsprechendes Verdünnen mit RNase freiem Wasser eine Konzentration von 1000ng pro 10µl eingestellt. Das totale RNA Volumen und RNase freies Wasser ergaben den Template-Mix (für eine Reaktion):

Reagenz	Volumen
Total RNA	variabel
Water	variabel
Total	10 µl

Folgende Komponente wurden für den MasterMix (für eine Reaktion) in ein steriles, Nuklease freies PCR Tube pipettiert:

Reagenz	Volumen (µl)
Hexamer Primer	2
Puffer	4
RNase Inhibitor	0,5
dNTPs	2
Transkriptase	0,5
Total	9

Der MasterMix und der Template-Primer Mix wurden in 02 PCR-stripes vorsichtig vermischt und kurz zentrifugiert.

Anschließend wurden die PCR-stripes im Thermo Cycler inkubiert:

1. Annealing der Primer an das RNA-Template: 10 min bei 25°C
2. cDNA-Synthese: 30 min bei 55°C
3. Denaturierung des Enzyms: 5 min bei 85°C
4. Schutz vor Degradation: ∞ bei 4°C

Die Gesamtdauer der Inkubation betrug 45 Minuten.

### 3.2.2.6 Amplifikation der spezifischen HPV-Onkogene E6/E7 mittels nested PCR

#### 3.2.2.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

##### a) Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen durch eine in vitro durchgeführte DNA-Replikation.

Beliebiges genomisches Material kann dabei exponentiell vervielfacht werden.

Bestandteile: - DNA-Matrize (Template)  
- thermostabile DNA-Polymerase  
- Forward- und Reward-Primer  
- dNTPS  
-  $MgCl_2$

##### Ablauf:

Das Reaktionsverfahren besteht aus 40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Teilschritten besteht:

- *Denaturierung:* Auftrennung der DNA-Matrize in Einzelstränge durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen durch Erhitzen (95°C)
- *Annealing:* Das Primerpaar, bestehend aus Oligodesoxyribonukleotide, lagert sich an den komplementären Bereich des passenden DNA-Einzelstranges und ermöglicht damit die Replikation. Die Temperatur ist abhängig von der Primer Schmelztemperatur.
- *DNA-Synthese:* die DNA-Polymerase verlängert die Primer an ihrem freien 3'-OH-Ende mit Hilfe von dNTPs bei einem Temperaturoptimum von 72°C.

##### b) Durchführung

Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf sterilen Arbeitsflächen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Alle Reagenzien wurden während des Pipettierens auf Eis gelegt.

Pro Tube wurden 9 µl MasterMix und 1 µl cDNA in PCR-Stripes pipettiert.

Der MasterMix enthielt pro Probe folgende Komponenten:

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)
Puffer + dNTPs	10x	1
Spezifische Primer forward	10µM	3
Spezifische Primer reverse	10µM	1
RNase freies Wasser		1
Taq Polymerase	5U/µl	3
Total		9
+ 1µl cDNA		10

Die Anzahl der Stripes richtete sich nach der Anzahl der zu untersuchenden Patientenproben.

Bei jedem PCR-Ansatz wurden Negativkontrollen mitgeführt, bestehend aus allen PCR-Komponenten, ausgenommen der DNA.

Pro Patientin wurden folgende Primer benötigt:

- KRT 13 (Referenzgen)
- RPLP0 (Referenzgen)
- spezifische externe E6/E7 Primer des jeweiligen HPV-Subtypen

Da die Referenzgene konstant exprimiert werden und nicht internen oder externen regulatorischen Einflüssen unterliegen, dienen sie dazu die Unversehrtheit der extrahierten RNA und der synthetisierten cDNA als Template, sowie die Funktionalität des PCR-Programmes zu beweisen.

Folgende high-risk-HPV-Primer stehen zur Verfügung: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 66.

Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurden die PCR-stripes für folgendes Amplifizierungsprogramm im Thermocycler inkubiert:

#### PCR-Programm:

- |           |                        |                            |
|-----------|------------------------|----------------------------|
| 1. Phase: | 10 min bei 95°C        | → initiale Denaturierung   |
| 2. Phase: | 20 sec bei 95°C        | → Denaturierung            |
|           | 20 sec bei 56°C        | → Annealing                |
|           | 20 sec bei 72°C        | → Elongation               |
|           | → zu jeweils 40 Zyklen |                            |
| 3. Phase: | 5 min bei 72°C         | → abschließende Elongation |
|           | ∞ bei 4°C              |                            |

### **3.2.2.6.2 Nested PCR**

#### **a) Prinzip**

Ziel der nested PCR ist die Steigerung der Produktspezifität und die Vermeidung der Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte der ersten PCR.

Die erste PCR amplifiziert DNA mit externen Primern, wohingegen die darauffolgende nested PCR interne Primer verwendet. Das Produkt der ersten PCR wird als Template für die nested PCR benutzt.

Unspezifische Produkte der ersten PCR weisen kaum komplementäre Sequenzen für interne Primer auf und stehen somit nicht mehr als Template der nested PCR zur Verfügung. Damit erhöht sich die Spezifität und Empfindlichkeit der DNA-Amplifikation enorm.

#### **b) Durchführung**

2 µl des Reaktionsprodukts der ersten PCR wurden als Template für die nested PCR verwendet und mit 8µl MasterMix vermengt und zentrifugiert.

Als Negativkontrollen wurden Ansätze mit allen nested PCR-Komponenten, aber ohne DNA verwendet.

Die Präparation des MasterMix für die nested PCR wurde nach dem gleichen Schema wie für die erste PCR durchgeführt. Nur die Primer wurden so gewählt, dass eine HPV-Subtyp-spezifische Sequenz des E6 und E7 Gens amplifiziert wurde. Das PCR-Programm entsprach dem der ersten PCR.

### **3.2.2.7 Gelelektrophorese**

#### **3.2.2.7.1 Prinzip der Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese dient zur Trennung geladener Teilchen (wie DNA-Fragmente) nach ihrer Ladung und Größe in einem elektrischen Feld.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt proportional zum negativen dekadischen Logarithmus ihrer Größe.

Die negativen Ladungen der Phosphatgruppe der DNA wandern zur Anode.

Durch Änderung der Agarosekonzentration variiert die Porengröße der Gele, d.h. je kleiner die zu trennenden Fragmente sind, desto höher muss die Agarosekonzentration sein.

Damit es zu keiner Diffusion der Proben im TBE-Puffer kam, wurde zu jeder Probe ein Loading Dye mit Bromphenolblau gegeben, der zur Beschwerung der Proben diente.

Das Ethidiumbromid fungierte als Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung der Nukleinsäuren. Es schiebt sich zwischen die Basen der Nukleinsäuren und erscheint nach Anregung mit UV-Licht als leuchtende Bande.

Die Banden bestehen aus DNA-Fragmenten ähnlicher Länge.

### **3.2.2.7.2 Durchführung der Gelelektrophorese**

#### **a) Herstellung des TBE-Puffers**

In einen 5 Liter Kanister wurden 4500 ml Aqua dest. mit 500 ml TBE (10x) vermischt, um ein Verhältnis von 1:10 zu erreichen.

#### **b) Herstellung des 2% Agarosegels**

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 2 g Agarose mit 100 ml TBE 1x Puffer solange bei 900 W in der Mikrowelle aufgekocht bis das Gemisch transparent wurde. Bevor das Gel aushärtet, wurde als Farbstoff 3 µl Ethidiumbromid zum flüssigen Agarosegel gegeben und darin durch vorsichtiges Schwenken des Kolben vermengt. Das Gel wurde danach in einen Tischbehälter mit zwei Kämmen (2x20 well, 1,0 mm) gegossen, die die Taschen für die spätere Beladung mit den Proben bildeten.

#### **c) Ablauf der Gelelektrophorese**

Das vollständig ausgehärtete Gel wurde nun in eine Gelelektrophoresekammer gelegt und vollständig mit TBE-Puffer bedeckt. TBE diente als Laufpuffer.

Zur Abschätzung der Länge und Größe der isolierten Nukleinsäure wurde in die erste und letzte Tasche jeweils 7 µl DNA-Marker (peq Gold DNA-Sizer XIII) pipettiert.

Zu jedem PCR Produkt wurde 1 µl Loading Dye (6x) zugesetzt und im Anschluss in die Taschen im Gel pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V für ca. 50 Minuten.

### 3.2.2.7.3 Auswertung

Mit Hilfe des Kamerasystems Multi Image Light Cabinet Filter wurde das Gel abfotografiert und ausgewertet.

Durch Vergleich der Laufstrecke der DNA-Fragmente mit dem Standard (siehe Abbildung 3.3) ließ sich die Länge des Fragments ablesen.

Aus der Differenz der bekannten Gesamtlänge der DNA und der E6 Intron-Länge resultierte die Länge der gespleißten Bande (mRNA) und diente somit als Nachweis eines gespleißten HPV E6 und E7 Onkogen-Transkriptes (siehe Tabelle 3.1). Unter allen untersuchten HPV-Typen ist HPV 16 der einzige Genotyp, der zwei Splicingvarianten aufweist und somit zwei Banden zeigt. Die restlichen HPV-Subtypen besitzen nur eine gespleißte Bande.

HPV	16		18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	66	68
DNA [bp]	406		322	391	369	418	394	394	502	448	458	408	497	472	397
Intron [bp]	182	299	182	202	277	182	182	182	224	277	254	277	398	254	182
mRNA [bp]	224	107	140	189	92	236	212	212	278	171	204	131	99	218	215

**Tabelle 3.1 Länge der Amplifikate (nach [108])**

Zur weiteren Bearbeitung und zur Dokumentation wurden die Fotos der Agarosegele auf einem Computer gespeichert.

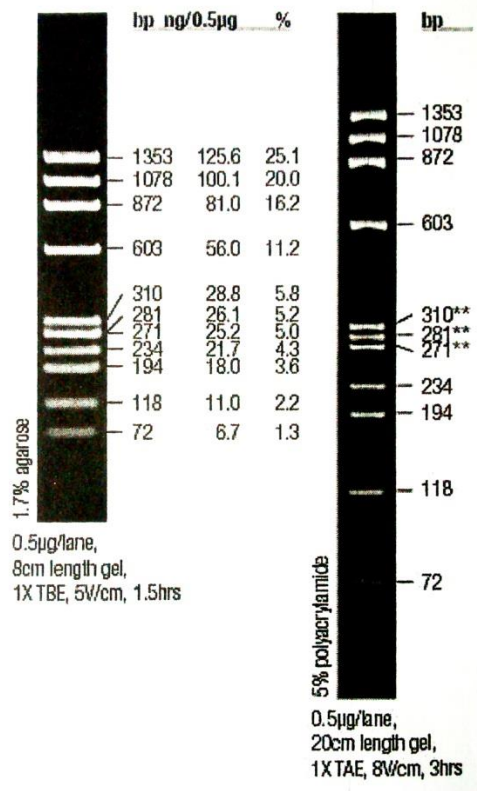


Abbildung 3.3 Die Legende zum verwendeten Größenstandard vom Hersteller Peq Lab Biotechnologie

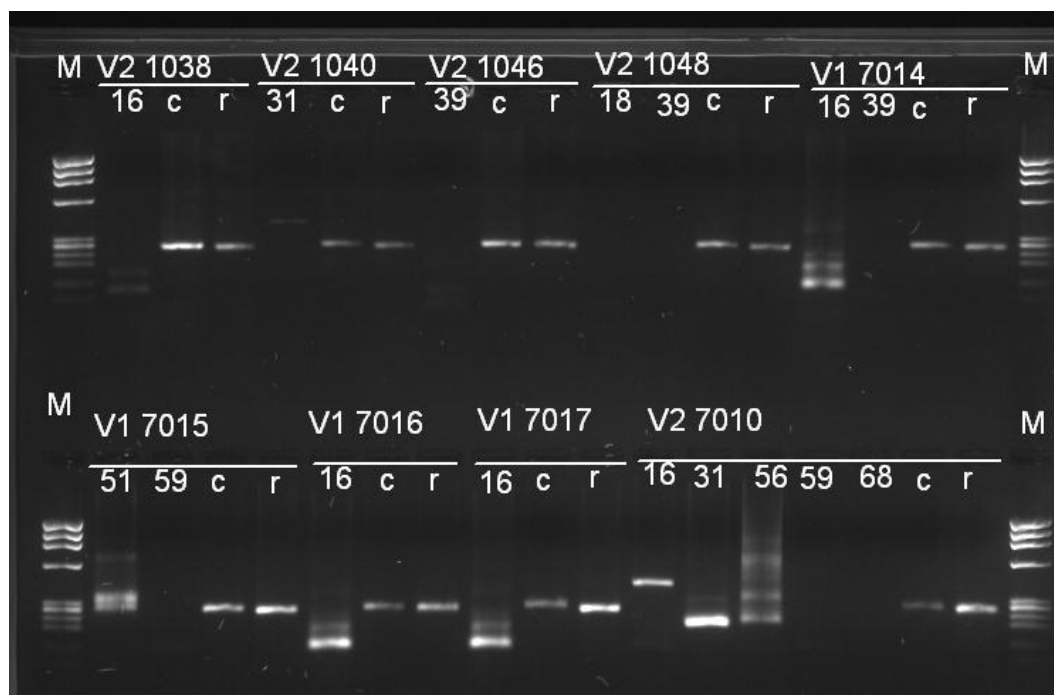


Abbildung 3.4 Produkte der nested PCR liefern mittels Gelelektrophorese den Nachweis in welchem transkriptionellen Zustand die mRNA der high-risk-HPV-Subtypen vorliegt

### **3.2.2.8 Statistische Auswertung**

Die Daten der prospektiven, randomisierten, einfach verblindeten Longitudinalstudie wurden mit dem Statistikprogramm SAS 9.4 für Windows (SAS Institute, Cary, NC, USA) und dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2010 ausgewertet.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde Excel 2010 verwendet. Die Boxplotdarstellung wurde mit Excel 2016 angefertigt.

Um Zusammenhänge zweier oder mehrerer Variablen zu analysieren, wurden der Chi-Quadrat-Test und der exakte Fisher Test angewendet.

Für die verwendeten statistischen Tests wurde ein Zusammenhang als signifikant angenommen, wenn der p-Wert kleiner 0,05 war.

### **3.2.2.9 Genehmigung der Studie durch die Ethik-Kommission**

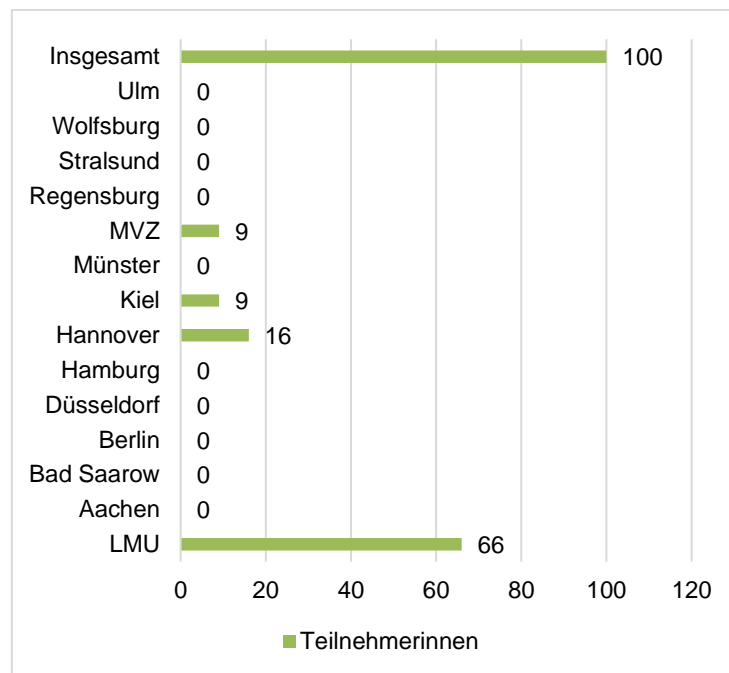
Eine Genehmigung durch die Ethik-Kommission der Universität München liegt vor. Projektnummer: 275-14 (Vorsitz: Prof. Dr. Wolfgang Eisenmenger)



## 4 Ergebnisse

Insgesamt wurden 100 Patientinnen operiert, die aufgrund von hochgradigen Zervixdysplasien im Zeitraum von September 2014 bis Dezember 2016 von einem niedergelassenen Gynäkologen im Rahmen von regulären Kontrolluntersuchungen überwiesen wurden.

Die 100 Patientinnen wurden in Dysplasiezentren aus ganz Deutschland rekrutiert (siehe Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1 Übersicht der eingeschlossenen Patientinnen der einzelnen teilnehmenden Zentren**

Für die vorliegende prospektive Multizenterstudie wurden insgesamt 120 Patientinnen rekrutiert. Zwischen dem Zeitraum der Rekrutierung und der Konisation wurden 20 Patientinnen ausgeschlossen, da sie nicht mehr die Einschlusskriterien erfüllten. Die verbliebenen 100 Patientinnen wurden nach der durch Randomisierung zugeteilten OP-Methode konisiert.

Die Abbildung 4.2 illustriert die Anzahl der teilnehmenden Patientinnen zu jedem Untersuchungsintervall.

Aufgrund der erschwerten Rekrutierung wurde die Studie nach zwei Jahren abgebrochen.

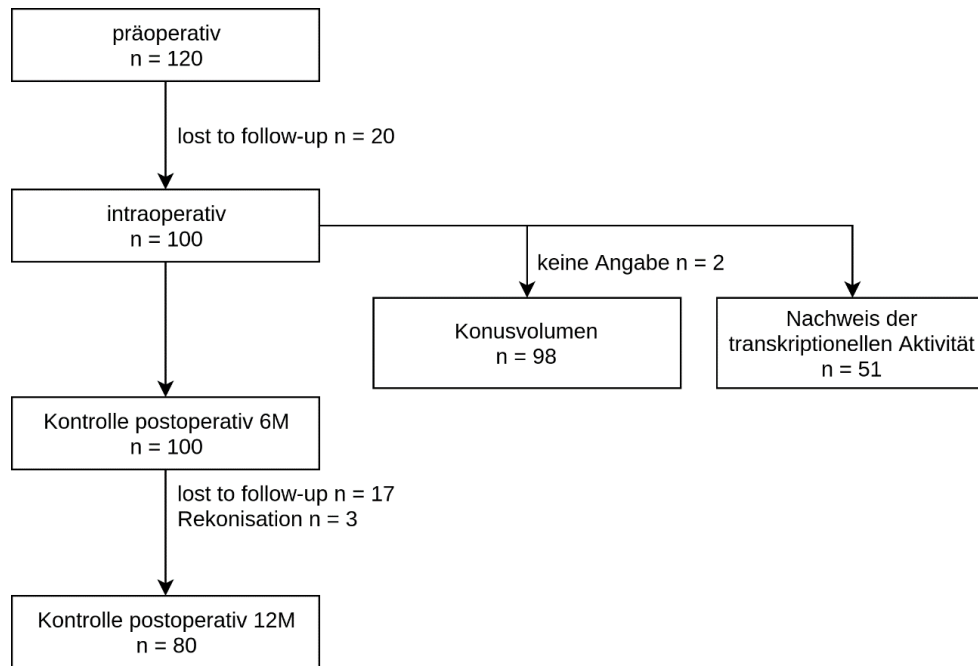


Abbildung 4.2 Flowchart der eingeschlossenen Patientinnen zu den einzelnen Besuchen

#### 4.1 Altersstruktur der Patientinnen

Die Altersverteilung der 100 untersuchten Patientinnen lag zum Zeitpunkt der Konisation zwischen 23 und 47 Jahren.

Keine der eingeschlossenen Studienteilnehmerinnen war zum Zeitpunkt der Operation jünger als 20 Jahre. 40 Patientinnen waren im Alter zwischen 20 und 29 Jahren. 56 Patientinnen wurden zwischen 30 und 39 Jahren operiert. Zwischen 40 und 50 Jahren gab es nur 4 Teilnehmerinnen.

Der gesamte Altersdurchschnitt aller Studienteilnehmerinnen lag bei 31,4 Jahren.

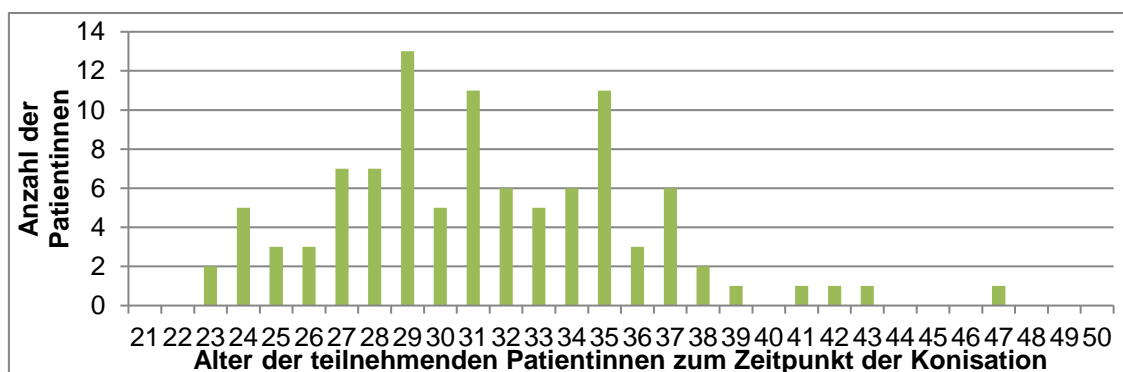


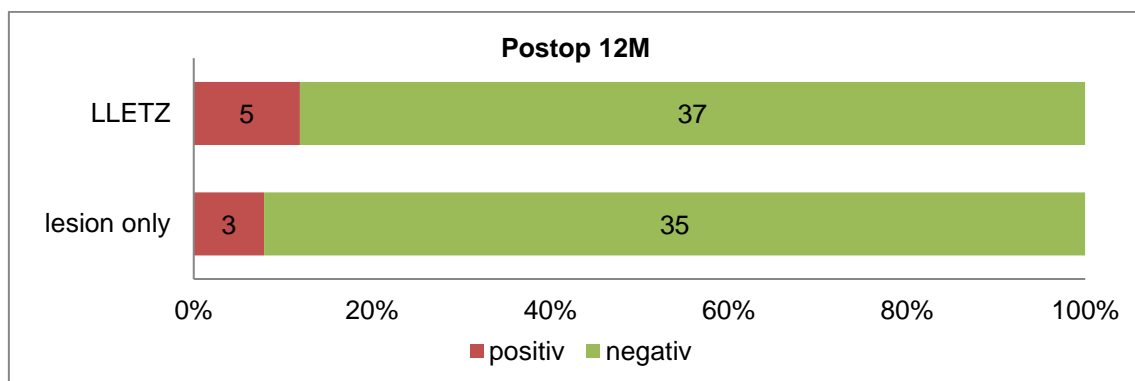
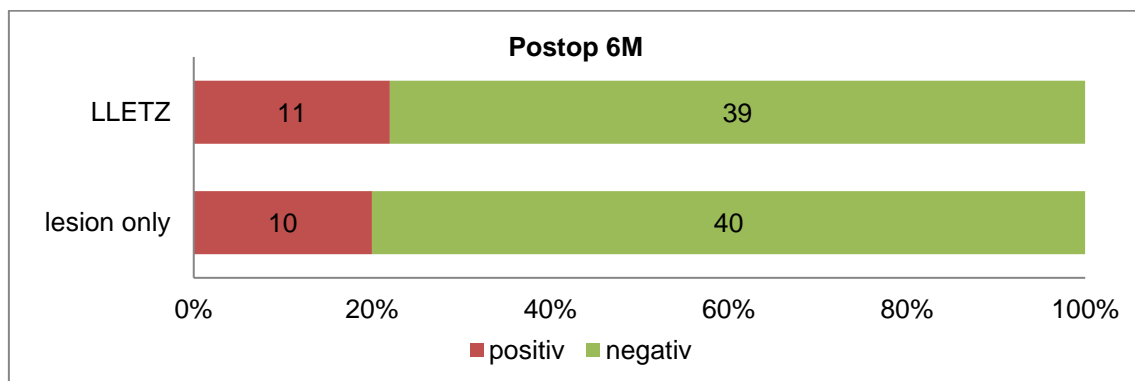
Abbildung 4.3 Altersverteilung aller Studienteilnehmerinnen zum Zeitpunkt der Konisation

## 4.2 Primäres Zielkriterium: HPV Test prä- und postoperativ

Patientinnen, die zur Gruppe der herkömmlichen Hochfrequenzschlingenkonisation (= LLETZ) gehörten, hatten im Rahmen der regulären Nachsorgeuntersuchung nach einem Intervall von 6 Monaten, in 78% (39/100) der Fälle ein negatives HPV-Testergebnis. Die gezielte Resektion lediglich der kolposkopisch auffälligen Läsion (= lesion only) erzielte bei 80% (40/100) der Patientinnen nach 6 Monaten ein negatives HPV-Testergebnis. Im Intervall nach 12 Monaten postoperativ hatten 92% der Patientinnen der lesion only Gruppe und 88% der Patientinnen der LLETZ Gruppe ein negatives high-risk-HPV-Testergebnis.

		negativer HPV-Test	
Postop 6M	LLETZ	39	78%
	lesion only	40	80%
Postop 12M	LLETZ	37	88%
	lesion only	35	92%

**Tabelle 4.1 Vergleich der HPV-Testergebnisse im gesamten Patientinnenkollektiv in Abhängigkeit von der Zuordnung der OP-Methode**



**Abbildung 4.4 Vergleich der HPV-Testergebnisse in Abhängigkeit von der Zuordnung der OP-Methode**

### 4.3 Sekundäre Zielkriterien: Zytologie und Histologie prä- und postoperativ

#### 4.3.1 Prävalenz und Vergleich der prä- und postoperativen zytologischen Befunde

Im Folgenden werden die prä- und postoperativen zytologischen Ergebnisse anhand der Zuteilung der beiden OP-Methoden aufgezeigt.

		Pap I/IIa	Pap IIp	Pap IIIp	Pap IIID1	Pap IIID2	Pap IVa-p	Total
LLETZ	Präop	0	0	1	1	11	37	50
		0%	0%	2%	2%	22%	74%	100%
	Postop 6M	35	5	3	6	0	1	50
		70%	10%	6%	12%	0%	2%	100%
	Postop 12M	30	4	0	7	0	0	41
		73%	10%	0%	17%	0%	0%	100%
lesion only	Präop	1	0	3	1	13	32	50
		2%	0%	6%	2%	26%	64%	100%
	Postop 6M	31	11	1	2	3	2	50
		62%	22%	2%	4%	6%	4%	100%
	Postop 12M	34	3	0	1	0	1	39
		87%	8%	0%	3%	0%	3%	100%

Tabelle 4.2 Prä- und postoperative Verteilung der zytologischen Befunde in Abhängigkeit von der OP-Methode

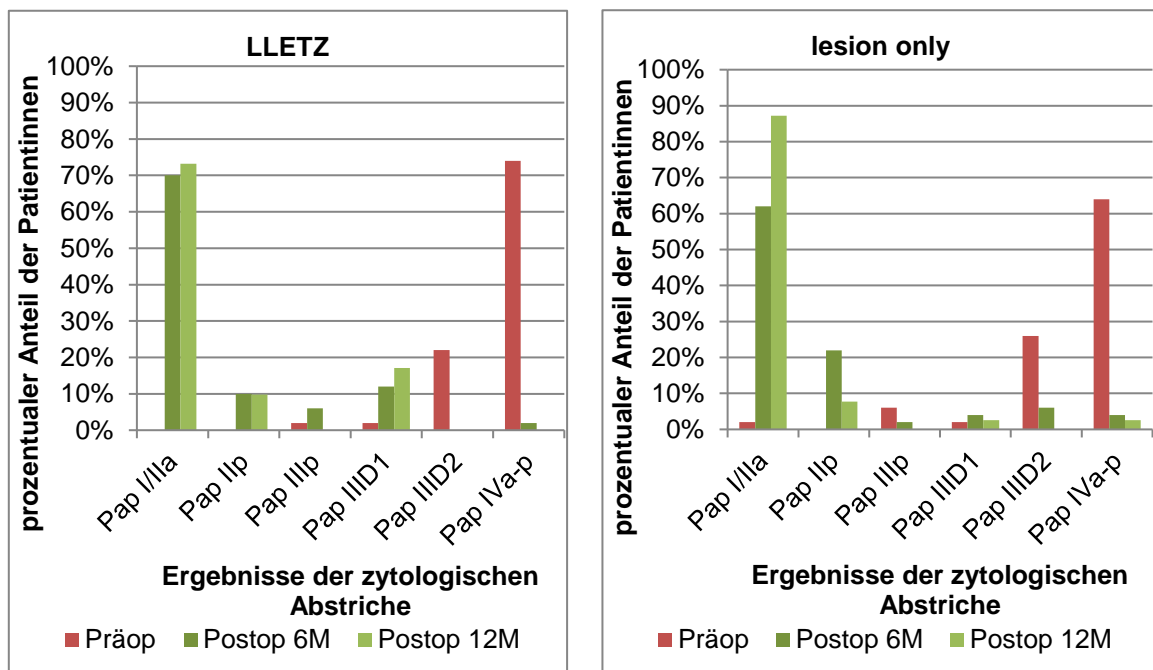


Abbildung 4.5 Graphische Einteilung der zytologischen Befunde nach OP-Methode im gesamten Studienkollektiv

Präoperativ wurden nur Patientinnen mit einem positiven HPV-Test für die Hochrisikogruppen und histologisch gesicherter CIN III in die Studie aufgenommen.

Bei der OP-Methode nach LLETZ hatte keine Patientin einen unauffälligen Zytologie-Befund, im Sinne eines Pap I/IIa. Unter der lesion only Gruppe gab es eine Patientin mit einem unauffälligen zytologischen Befund.

Die meisten Patientinnen erhielten die Diagnose einer hochgradigen Zellveränderung im Sinne eines Pap IV a-p: LLETZ 74% (37/50) und lesion only 64% (32/50).

6 Monate postoperativ hatten 70% der Patientinnen, die nach LLETZ operiert wurden, einen unauffälligen Pap-Abstrich (Pap I/IIa: 35/50), Pap IIp kam bei 10% (5/50) der Patientinnen vor. 62% der Patientinnen (31/50), die nach der modifizierten lesion only OP-Methode therapiert wurden, erhielten eine unauffälligen Pap I/IIa Abstrich. Einen Pap IV a-p Abstrich konnte in der LLETZ Gruppe bei einer Patientin und nach der lesion only Methode bei zwei Patientinnen nachgewiesen werden.

12 Monate postoperativ hatten Patientinnen der lesion only Gruppe mit 87% (34/39) unauffälligen Pap-Abstrichen (Pap I/IIa) ein besseres zytologisches Ergebnis als die LLETZ Gruppe mit 73% (30/41).

Eine Patientin, die die modifizierte Konisation erhielt, wies weiterhin einen Pap IVa-p Abstrich auf.

#### **4.3.2 Vergleich der histologischen Befunde prä-, intra- und postoperativ**

Haupteinschlusskriterium war neben dem HPV-Test unter anderem die präoperativ histologisch gesicherte CIN III.

Intraoperativ konnte im OP-Präparat in der LLETZ Gruppe von vorher 50 (100%) Patientinnen noch bei 46 (92%) Patientinnen eine CIN III diagnostiziert werden. Bei 4% (2/50) der Patientinnen zeigte sich zum Zeitpunkt der Konisation die Diagnose einer CIN I und bei weiteren 4% eine CIN II.

In der lesion only Gruppe hatten von insgesamt 50 Patientinnen intraoperativ 68% (34/50) eine CIN III Läsion. Bei 14% der Patientinnen wurde im OP-Präparat eine CIN I und bei 10% eine CIN II diagnostiziert.

Bei der Nachsorgeuntersuchung nach 6 und 12 Monaten wurde lediglich bei kolposkopischen Auffälligkeiten eine histologische Sicherung durchgeführt. In beiden Gruppen gab es jeweils eine Patientin die 6 Monate nach der Konisation histologisch nachgewiesen eine CIN III aufwies und im Verlauf eine Rekonisation erhielten. 86% der Patientinnen (43/50) waren nach der LLETZ Methode und 88% der Patientinnen (44/50) waren nach der lesion only Methode dysplasiefrei.

10% der Patientinnen (5/50) der LLETZ Gruppe und 6% der Patientinnen (3/50) der lesion only Gruppe wurden nach 6 Monaten eine CIN I Läsion diagnostiziert. Eine mittelgradige Dysplasie (CIN II) wiesen 2 (4%) Patientinnen der lesion only Gruppe und eine (2%) Patientin der LLETZ Gruppe auf.

12 Monate postoperativ waren 93% der Patientinnen (39/42) der LLETZ Gruppe und 100% der Patientinnen der lesion only Gruppe ohne Nachweis einer Dysplasie.

Eine CIN I Läsion kam bei 5% der Patientinnen (2/42) nach der radikaleren OP-Methode (LLETZ) und bei keiner der Patientinnen nach der modifizierten OP-Methode (lesion only) vor. Die Diagnose einer CIN II Läsion ein Jahr postoperativ erhielten 2% der Patientinnen (1/42) der LLETZ Gruppe und keine der Patientinnen der lesion only Gruppe.

12 Monate postoperativ kam bei beiden OP-Gruppen keine CIN III Läsion vor.

	LLETZ				lesion only				Total
	CIN I	CIN II	CIN III	keine	CIN I	CIN II	CIN III	keine	
<b>Präop</b>	0 (0%)	0 (0%)	50 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	50 (100%)	0 (0%)	100
<b>Intraop</b>	2 (4%)	2 (4%)	46 (92%)	0 (0%)	7 (14%)	5 (10%)	34 (68%)	4 (8%)	100
<b>Postop 6M</b>	5 (10%)	1 (2%)	1 (2%)	43 (86%)	3 (6%)	2 (4%)	1 (2%)	44 (88%)	100
<b>Postop 12M</b>	2 (5%)	1 (2%)	0 (0%)	39 (93%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	38 (100%)	80

**Tabelle 4.3 Übersicht der histologischen Auswertungen prä-, intra- und postoperativ anhand der OP-Methode**

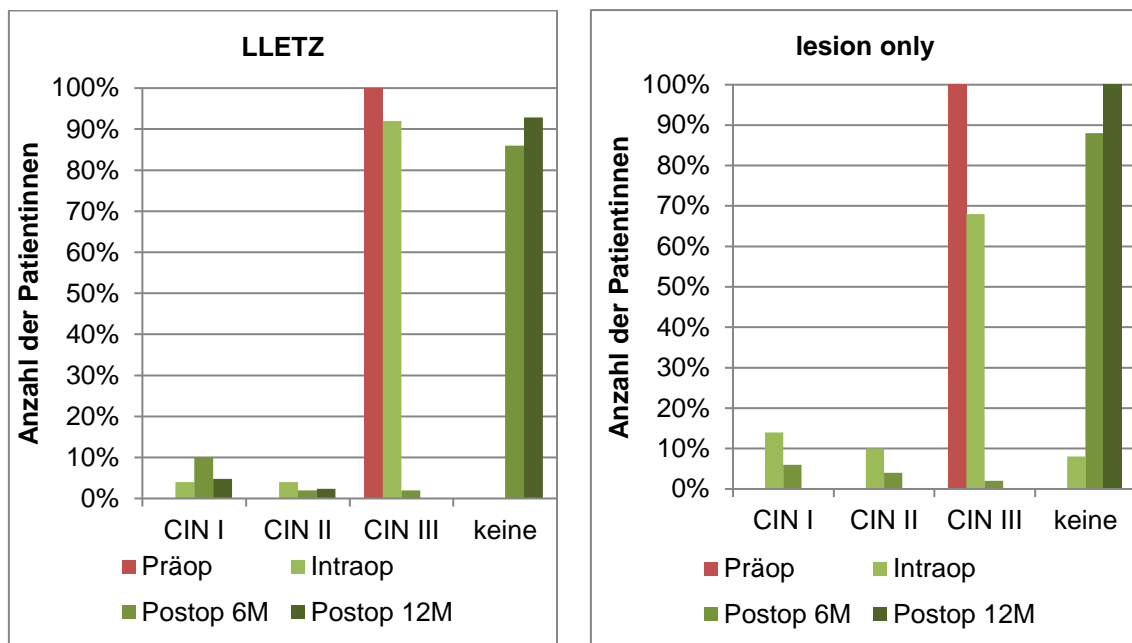


Abbildung 4.6 Graphische Gegenüberstellung der beiden OP-Methoden aufgeteilt nach den histologischen Befunden prä-, intra- und postoperativ

#### 4.4 Weitere Vergleichsparameter

##### 4.4.1 Resektionsränder

In dieser Auswertung werden die beiden OP-Methoden hinsichtlich der Beurteilung der Resektionsränder aufgeführt.

Bei der klassischen LLETZ wurde in 92% der Fälle eine Resektion im Gesunden (in sano) erzielt.

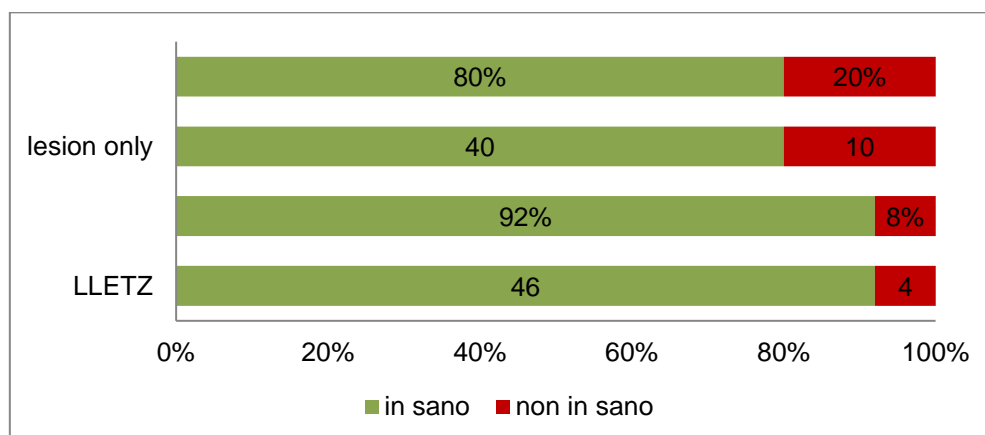


Abbildung 4.7 Gegenüberstellung der ermittelten Resektionsränder der jeweiligen OP-Methode

Die gezielte Resektion lediglich der kolposkopisch auffälligen Läsion (lesion only) ergab in 80% der Gewebeproben das Resultat einer Entfernung von resektionsfreien Rändern (in sano).

	<b>LLETZ</b>		<b>lesion only</b>	
<b>in sano</b>	46	92%	40	80%
<b>non in sano</b>	4	8%	10	20%

**Tabelle 4.4 Gegenüberstellung der histologisch untersuchten Resektionsränder beider OP-Methoden**

<b>Resektion HPV Test 6M</b>	<b>in sano</b>		<b>non in sano</b>		<b>Total</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>LLETZ</b>	10 20%	36 72%	1 2%	3 6%	50 100%
<b>lesion only</b>	8 16%	32 64%	2 4%	8 16%	50 100%
<b>Total</b>	18 18%	68 68%	3 3%	11 11%	100 100%

**Tabelle 4.5 Darstellung des Zusammenhangs zwischen der intraoperativen histopathologischen Beurteilung und den Ergebnissen des HPV-Test 6 Monate postoperativ**

Tabelle 4.5 stellt dar, ob der intraoperative histopathologische Befund mit den HPV-Testergebnissen 6 Monate postoperativ korreliert. Anhand der Tabelle ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer non in sano Resektion und einem postoperativ häufiger auftretenden positiven high-risk-HPV-Test eruieren.

#### **4.4.2 Konusvolumina**

Die Volumenmessung des Präparats erfolgte unmittelbar postoperativ in einem mit NaCl gefülltem Gefäß (z.B. 15ml Falcon Tube, bei großem Konus auch 50ml). Die Differenz des Flüssigkeitsspiegels ergab das Konusvolumen in ml. Der Mittelwert aller Konusvolumina der LLETZ war 1,97 ml, wohingegen bei der gezielten Resektion der Läsion der Mittelwert 1,02 ml betrug.

Mit dem Boxplot in Abbildung 4.9 wurden die Ausreißer den beiden OP-Methoden gegenübergestellt. Die operative Radikalität und damit verbunden die Größe des Konusvolumen richtete sich nach dem Ausmaß der Läsion.





Abbildung 4.8 Vergleich der Konusvolumina beider OP-Methoden

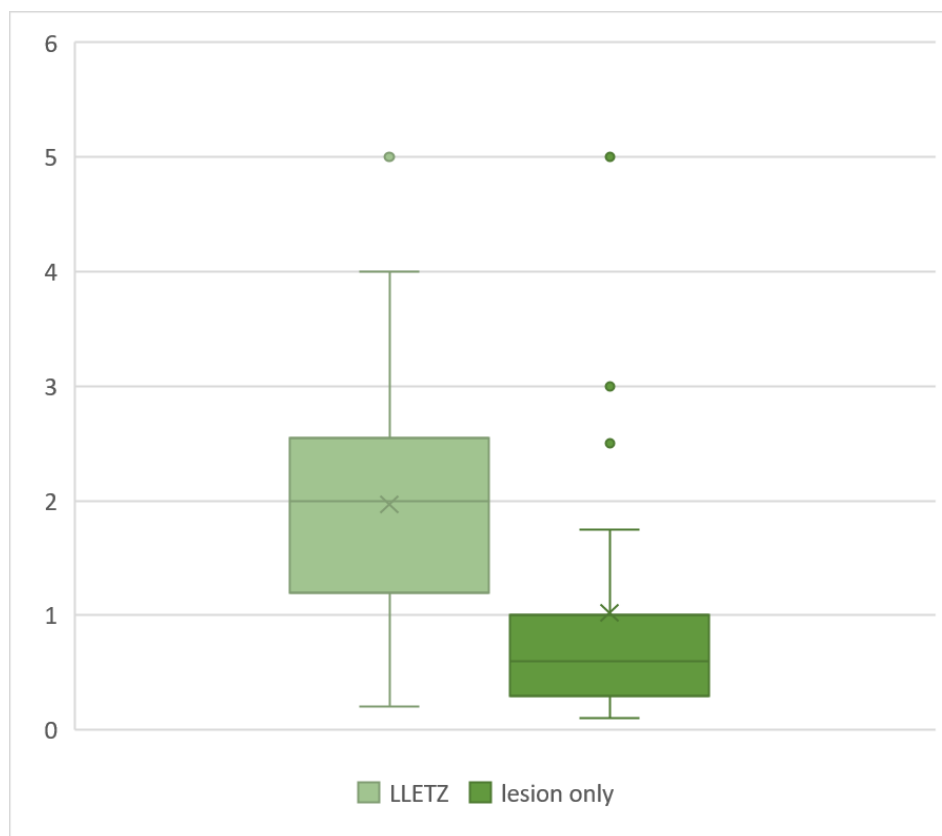


Abbildung 4.9 Werte der Konusvolumina beider OP-Methoden in Boxplotdarstellung

## **4.5 Molekularbiologische Zusatzuntersuchungen**

### **4.5.1 Genotypisierung**

#### **4.5.1.1 Prävalenz und Vergleich der HPV-Subtypen intra- und postoperativ**

Von 100 Patientinnen wurden intra- und postoperativ Abstriche auf das Vorkommen von 14 HPV-Subtypen (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) untersucht.

Der am häufigsten nachgewiesene high-risk-HPV-Subtyp zum Zeitpunkt der Operation war im gesamten Patientenkollektiv HPV 16, der bei 49% (66/134) der gesamten Abstrichproben gefunden wurde. Der zweithäufigste HPV-Subtyp war HPV 31 mit 10% (13/134) und der dritthäufigste Subtyp HPV 59 mit 7% (9/134) unter allen Patientinnen. Bei 5% (7/134) der Abstriche war intraoperativ kein HPV-Subtyp nachweisbar.

Postoperativ war ohne Berücksichtigung der OP-Methode HPV 16 mit 18% (17/95) nach 6 Monaten und mit 13% (8/61) nach 12 Monaten der häufigste Subtyp der gesamten Abstriche. HPV 31 und 59 wurden 6 Monaten jeweils gleich häufig nachgewiesen (5% (5/95)). Ein halbes Jahr später blieb der HPV-Subtyp 59 der zweithäufigste Subtyp mit 7% (4/61). Nach chirurgischer Intervention konnte nach 6 Monaten in 53% (50/95) der Abstriche und nach 12 Monaten in 57% (35/61) der Abstriche kein HPV-Subtyp mehr detektiert werden.

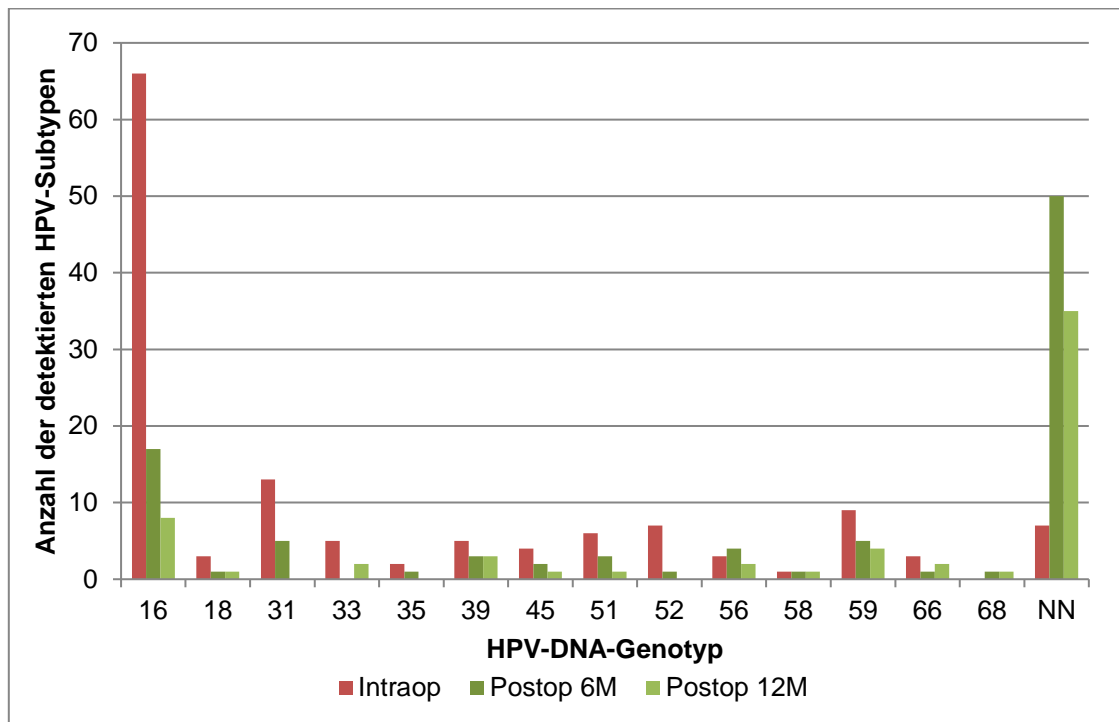


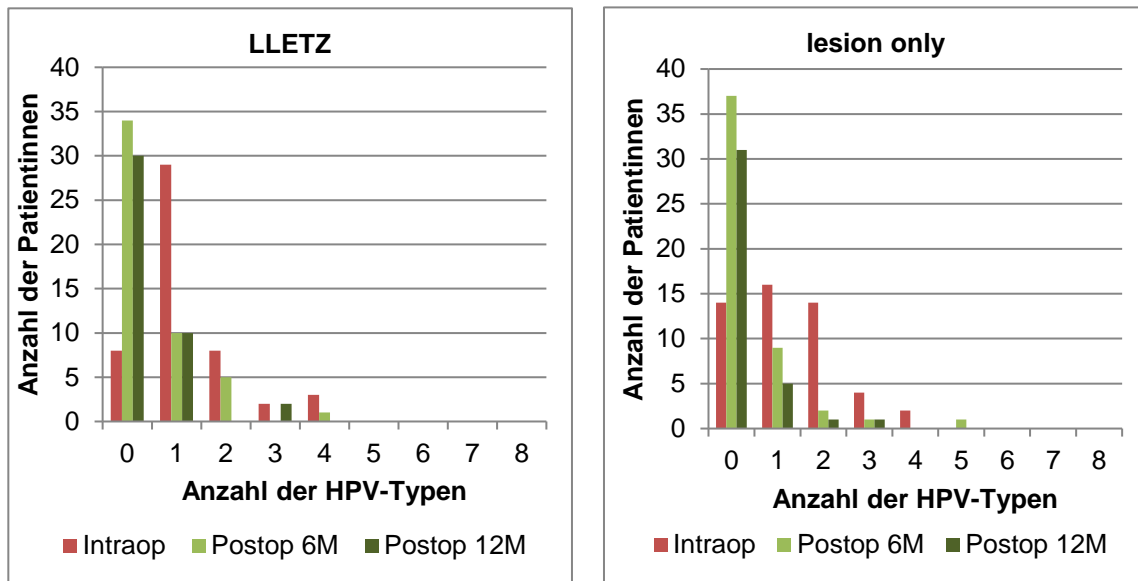
Abbildung 4.10 Schematische Häufigkeitsverteilung der einzelnen HPV-Subtypen im intra- und postoperativen Vergleich ohne Berücksichtigung der OP-Methode

	16	18	31	33	35	39	45	51
Intraop	66	3	13	5	2	5	4	6
	49%	2%	10%	4%	1%	4%	3%	4%
Postop 6M	17	1	5	0	1	3	2	3
	18%	1%	5%	0%	1%	3%	2%	3%
Postop 12M	8	1	0	2	0	3	1	1
	13%	2%	0%	3%	0%	5%	2%	2%

	52	56	58	59	66	68	NN	Total
Intraop	7	3	1	9	3	0	7	134
	5%	2%	1%	7%	2%	0%	5%	100%
Postop 6M	1	4	1	5	1	1	50	95
	1%	4%	1%	5%	1%	1%	53%	100%
Postop 12M	0	2	1	4	2	1	35	61
	0%	3%	2%	7%	3%	2%	57%	100%

Tabelle 4.6 intra- und postoperative Gegenüberstellung der Häufigkeitsverteilung der einzelnen HPV-Subtypen

Aus der Abbildung 4.10 und der Tabelle 4.6 wird deutlich, dass der Prozentsatz an nachweisbaren HPV-Subtypen nach chirurgischer Intervention bei allen HPV-Subtypen abgenommen hat. Lediglich bei den HPV-Subtypen 58 und 68 konnte nach der Operation keine Abnahme der Prävalenz beobachtet werden.



**Abbildung 4.11 Anzahl der HPV-Subtypen, die zu den drei Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zu den beiden OP-Methoden gleichzeitig nachgewiesen werden konnten**

Abbildung 4.11 veranschaulicht, wie viele HPV-Subtypen zum Zeitpunkt der Operation und den beiden Nachsorgeuntersuchungen 6- und 12- Monate postoperativ gleichzeitig in einem Abstrich vorlagen.

Zu sehen ist, dass das HPV-Spektrum mit zunehmendem Beobachtungszeitraum abnahm. Bei beiden OP-Methoden war intraoperativ die Infektion mit 4 HPV-Subtypen die häufigste Anzahl an gleichzeitig vorkommenden Subtypen. 6 Monate postoperativ war in der lesion only Gruppe mit 5 gleichzeitig vorkommenden HPV-Subtypen die größte Summe an HPV-Subtypen in einem Abstrich. Im Abstrich 12 Monate postoperativ war bei beiden OP-Methoden die gleichzeitige Infektion mit 3 HPV-Subtypen die größte Anzahl an HPV-Subtypen.

#### **4.5.1.2 Korrelation zwischen HPV-Persistenz und auffälliger Zytologie postoperativ und dem vorbestehenden HPV-Subtypen**

Bei dieser Auswertung wurde nachverfolgt, welche Auswirkung der typenspezifische HPV-Nachweis auf die zytologischen und histologischen Befunde im Rahmen der Kontrolluntersuchung 6 Monate postoperativ hat. Außerdem bietet die Tabelle 4.7 einen Überblick der gesamten Befunde des Kollektivs zum Zeitpunkt 6 Monate postoperativ.

HPV - Subtyp	16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	66	68	NN	Total	
<b>HPV Testergebnis</b>																<b>95</b>	<b>100%</b>
positiv	10	0	3	0	1	2	2	2	0	3	1	3	0	1	2	30	32%
negativ	7	1	2	0	0	1	0	1	1	1	0	2	1	0	48	65	68%
<b>Zytologie Befund</b>																<b>95</b>	<b>100%</b>
Pap I/IIa	8	1	3	0	1	1	1	1	1	2	1	3	1	1	37	62	65%
Pap IIp	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	9	15	16%
Pap IIIp	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	6	6%
Pap IIID1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	6	6%
Pap IIID2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3	3%
Pap IVa-p	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3%
<b>Grad der Dysplasie</b>																<b>95</b>	<b>100%</b>
CIN I	2	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	2	0	0	2	10	11%
CIN II	3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	7	7%
CIN III	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	3%
keine Dysplasie	11	1	3	0	0	2	2	2	1	1	1	2	1	0	48	75	79%

**Tabelle 4.7 Vergleich der morphologischen Befunde in Abhängigkeit der 14 verschiedenen high-risk-HPV-Subtypen**

Von 95 Abstrichen hatten 6 Monate nach der Operation 32% (30/95) der Abstriche ein positives high-risk-HPV-Testergebnis und 68% (65/95) einen negativen high-risk-HPV-Befund.

Von den 30 positiven Abstrichen waren in der Genotypisierung 10 mit HPV 16, jeweils 3 Abstriche mit HPV 31, 56, 59, jeweils zwei mit HPV 39, 45, 51, jeweils einer mit HPV 35, 58 und 68 infiziert. Es konnte keine Infektion mit den HPV-Subtypen 18, 33, 52 und 66 nachgewiesen werden. Von den 65 high-risk-HPV-negativen Abstrichen konnte in 48 Abstrichen im Rahmen der Genotypisierung kein HPV-Subtyp mehr nachgewiesen werden.

Bei der zytologischen postoperativen Auswertung gab es 3 Abstriche mit einer hochgradigen Zellveränderung im Sinne eines Pap IVa-p, davon waren 2 infiziert mit HPV 16 und ein Abstrich mit HPV 31.

Die HPV-Subtypen 16, 31 und 51 verursachten weiterhin histologisch eine CIN III Läsion in der Nachsorgeuntersuchung 6 Monate postoperativ.

#### 4.5.1.3 Einfluss chirurgischer Intervention an der Cervix uteri auf den HPV-DNA-Nachweis intra- und postoperativ

Im Rahmen der Genotypisierung und der Bewertung der biologischen Aktivität mit Hilfe der Detektion von Onkoproteinen E6/E7 sowohl prä- als auch postoperativ, ließ sich der Verlauf eines jeden HPV-Subtypen nachverfolgen. Das Virus galt als eradiziert, wenn es bei Studienbeginn nachweisbar und bei Studienende nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

	HPV 16		HPV 18		HPV 31	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
Status idem (gesund)	6 (21.4%)	8 (34.8%)	26 (92.9%)	21 (91.3%)	27 (96.4%)	18 (78.3%)
Neuinfektion	0 (0.0%)	1 (4.3%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Persistenz des Virus	6 (21.4%)	3 (13.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (8.7%)
Eradikation	16 (57.1%)	11 (47.8%)	1 (3.6%)	2 (8.7%)	1 (3.6%)	3 (13.0%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)
Total (ohne Eradikation)	12 (42.9%)	12 (52.2%)	27 (96.4%)	21 (91.3%)	27 (96.4%)	20 (87.0%)

	HPV 33		HPV 35		HPV 39	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
Status idem (gesund)	26 (92.9%)	22 (95.7%)	27 (96.4%)	23 (100.0%)	26 (92.9%)	22 (95.7%)
Neuinfektion	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)	2 (7.1%)	0 (0.0%)
Persistenz des Virus	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Eradikation	2 (7.1%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)
Total (ohne Eradikation)	26 (92.9%)	22 (95.7%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	22 (95.7%)

	HPV 45		HPV 51		HPV 52	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
Status idem (gesund)	23 (82.1%)	22 (95.7%)	25 (89.3%)	20 (87.0%)	26 (92.9%)	20 (87.0%)
Neuinfektion	1 (3.6%)	1 (4.3%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)
Persistenz des Virus	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Eradikation	4 (14.3%)	0 (0.0%)	2 (7.1%)	2 (8.7%)	2 (7.1%)	2 (8.7%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)
Total (ohne Eradikation)	24 (85.7%)	23 (100.0%)	26 (92.9%)	21 (91.3%)	26 (92.9%)	21 (91.3%)

	HPV 56		HPV 58		HPV 59	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
Status idem (gesund)	27 (96.4%)	22 (95.7%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	26 (92.9%)	20 (87.0%)
Neuinfektion	1 (3.6%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	2 (8.7%)
Persistenz des Virus	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Eradikation	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	1 (4.3%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)
Total (ohne Eradikation)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	27 (96.4%)	22 (95.7%)

	HPV 56		HPV 58	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
Status idem (gesund)	27 (96.4%)	22 (95.7%)	28 (100.0%)	22 (95.7%)
Neuinfektion	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)
Persistenz des Virus	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Eradikation	1 (3.6%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)
Total (ohne Eradikation)	27 (96.4%)	22 (95.7%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)

**Tabelle 4.8 (fortlaufend) Vergleich der beiden OP-Methoden hinsichtlich der Detektion jedes der 14 HPV-Subtypen im Zeitraum zwischen Operation und der Kontrolluntersuchung 6 Monate postoperativ**

Der status idem (gesund) bezeichnet einen Zustand, bei dem sowohl intraoperativ als auch bei der Nachsorgeuntersuchung 6 Monate postoperativ kein positiver Nachweis einer high-risk-HPV-Infektion nachgewiesen werden konnte.

Innerhalb von 6 Monaten kam es 15-mal zu einer Neuinfektion mit dem HPV-Virus. 7 Neuinfektionen (HPV 59: zweimal (8,7%); HPV 16, 45, 52, 56 und 68: jeweils einmal (4,3%)) wurden bei der modifizierten Methode lesion only und 8 Neuinfektionen (HPV 39: zweimal (7,1%); HPV 18, 35, 39, 51, 56 und 59: jeweils einmal (3,6%)) nach der klassischen LLETZ Methode ermittelt.

In der Operationsmethode nach LLETZ persistierte nur der HPV-Subtyp 16 (6-mal; 21,4%). In der lesion only Gruppe konnte bei den HPV-Subtyp16 dreimal (13,0%), bei dem HPV-Subtyp 31 zweimal (8,7%) und bei dem HPV-Subtyp 51 einmal (4,3%) eine Persistenz 6 Monate postoperativ nachgewiesen werden.

24-mal kam es unter den gesamten HPV-Subtypen in der OP-Methode nach lesion only zu einer Eradikation, im Vergleich dazu fand bei der klassischen Methode nach LLETZ 30-mal eine Eradikation statt.

## 4.5.2 Transkriptionsaktivität

### 4.5.2.1 Vergleich der intra- und postoperativen Dynamik der Dysplasie in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität

Um die Auswirkung der transkriptionellen Aktivität auf die morphologischen Befunde zu beurteilen, wurden zytologische und histologische Ergebnisse im Vergleich zum zusätzlichen Nachweis der Onkoproteine E6/E7 intra- und postoperativ untersucht.

	intraoperative transkriptionelle Aktivität				
	kein Splicing		Einfach-Splicing	Mehrfach-Splicing	Total
	NN	Ungespliced			
<b>HPV Testergebnis</b>					<b>51</b>
positiv	9 (18%)	4 (8%)	33 (65%)	5 (10%)	51 (100%)
negativ	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Zytologie Befund</b>					<b>51</b>
Pap I/IIa	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	1 (2%)
Pap IIp	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Pap IIIp	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)
Pap IIID1	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)
Pap IIID2	1 (2%)	1 (2%)	10 (20%)	1 (2%)	13 (25%)
Pap IVa-p	8 (16%)	3 (6%)	21 (41%)	3 (6%)	35 (69%)
<b>Grad der Dysplasie</b>					<b>51</b>
CIN I	2 (4%)	0 (0%)	3 (6%)	1 (2%)	6 (12%)
CIN II	0 (0%)	1 (2%)	2 (4%)	1 (2%)	4 (8%)
CIN III	5 (10%)	3 (6%)	27 (53%)	3 (6%)	38 (75%)
keine	2 (4%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	3 (6%)

**Tabelle 4.9 Vergleich der intraoperativen transkriptionellen Aktivität mit den erhobenen morphologischen Befunden**

Tabelle 4.9 stellt bei 51 Patientinnen die Auswirkung der Interaktion der Onkoproteine E6/E7 auf das intraoperative histologische und zytologische Ergebnis mit dem Nachweis von HPV dar. Alle 51 Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Konisation ein positives Testergebnis für high-risk-HPV-Typen. Die Mehrheit der Patientinnen (75%) wies hierbei E6/E7-Onkogentranskription in Form von Splicing auf.

Eine Patientin hatte intraoperativ trotz unauffälliger Zytologie (Pap I/IIa) ein Mehrfach-Splicing vorliegen. Die Mehrzahl der Patientinnen wiesen aktivierte Onkoproteine bei höhergradigen Zellveränderungen auf: Einfach-Splicing: 20%



mit Pap IIID2 (10/51) und 41% mit Pap IVa-p (21/51); Mehrfach-Splicing: 6% mit Pap IVa-p (3/51).

12% der Patientinnen (6/51) wiesen eine CIN I Läsion auf, wovon 2 (4%) keine biologische Aktivität zeigten, 3 (6%) ein Einfach-Splicing und eine Patientin (2%) mehrfach gespliced war.

Patientinnen mit einer CIN III Läsion hatten in 53% der Fälle (27/51) Einfach-Splicing und in 6% der Fälle (3/51) Mehrfach-Splicing vorzuweisen.

	postoperative transkriptionelle Aktivität (t=6 Monate)				
	kein Splicing		Einfach-Splicing	Mehrfach-Splicing	Total
	NN	Ungespliced			
<b>HPV Testergebnis</b>					<b>51</b>
positiv	3 (6%)	3 (6%)	3 (6%)	2 (4%)	11 (22%)
negativ	35 (69%)	1 (2%)	4 (8%)	0 (0%)	40 (78%)
<b>Zytologie Befund</b>					<b>51</b>
Pap I/IIa	28 (55%)	3 (6%)	3 (6%)	1 (2%)	35 (69%)
Pap IIp	5 (10%)	0 (0%)	1 (2%)	1 (2%)	7 (14%)
Pap IIIp	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)
Pap IIID1	5 (10%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	6 (12%)
Pap IIID2	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)
Pap IVa-p	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)
<b>Grad der Dysplasie</b>					<b>51</b>
CIN I	1 (2%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (4%)
CIN II	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)
CIN III	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)
keine	37 (73%)	2 (4%)	6 (12%)	1 (2%)	46 (90%)

**Tabelle 4.10 Vergleich der postoperativen transkriptionellen Aktivität (t= 6 Monate) mit den erhobenen morphologischen Befunden**

6 Monate postoperativ waren 78% (40/51) der Patientinnen high-risk-HPV negativ. Davon hatten 71% (36/51) Patientinnen keinen aktiven Splicing-Nachweis und 8% (4/51) Patientinnen waren einfach transkriptionell aktiv. Mehrfach-Splicing war unter den high-risk-HPV negativen Patientinnen nicht vorhanden. Bei 22% (11/51) Patientinnen mit positiven high-risk-HPV-Test waren 6 (12%) Patientinnen ohne und 5 (10%) Patientinnen mit Splicing-Nachweis.

Die zytologische Auswertung ergab bei 35 Patientinnen (69%) einen unauffälligen Abstrich, im Sinne von Pap I/IIa, davon waren 31 Patientinnen

(61%) ohne aktives Splicing, 3 Patientinnen (6%) mit Einfach-Splicing und eine Patientin (2%) mit Mehrfach-Splicing zuzuordnen.

Von postoperativ zwei Patientinnen mit CIN I Läsion hatte keine einen positiven aktiven E6/E7 Onkogen-Transkriptnachweis. Zwei Patientinnen erhielten eine histologisch gesicherte CIN II, wovon beide aktiv gespleißt waren und eine Patientin erhielt die Diagnose einer CIN III Läsion, die in einer inaktiven transkriptionellen Form vorlag.

Patientinnen mit mehrfach transkriptioneller Aktivität hatten postoperativ immer einen positiven HPV-Test, aber waren zytologisch unauffällig (Pap I/IIa: 1 Patientin; Pap IIp: 1 Patientin)

#### 4.5.2.2 Einfluss der OP-Methode auf die biologische Aktivität der Onkoproteine E6/E7

Diese Auswertung diente zum Vergleich des Verlaufs von biologischer Aktivität der Onkoproteine E6/E7 bezogen auf die beiden OP-Methoden. Zu jedem der 14 nachgewiesenen HPV-Subtypen wurde die biologische Aktivität untersucht und hinsichtlich des Einflusses der chirurgischen Intervention nach 6 Monaten bewertet.

	HPV 16		HPV 18		HPV 31	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
ungespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ungespliced -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)
ungespliced -> NN	0 (0.0%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)
gespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)
gespliced -> gespliced	3 (10.7%)	2 (8.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> NN	18 (64.3%)	10 (43.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (8.7%)
NN -> ungespliced	0 (0.0%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> gespliced	0 (0.0%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> NN	7 (25.0%)	8 (34.8%)	28 (100.0%)	22 (95.7%)	27 (96.4%)	19 (82.6%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)

	HPV 33		HPV 35		HPV 39	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
ungespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ungespliced -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ungespliced -> NN	1 (3.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)
gespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> NN	1 (3.6%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)
NN -> NN	26 (92.9%)	22 (95.7%)	27 (96.4%)	23 (100.0%)	27 (96.4%)	22 (95.7%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)

	HPV 45		HPV 51		HPV 52	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
ungespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ungespliced -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ungespliced -> NN	2 (7.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)
gespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> NN	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	1 (4.3%)
NN -> ungespliced	1 (3.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> gespliced	0 (0.0%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> NN	24 (85.7%)	22 (95.7%)	27 (96.4%)	22 (95.7%)	26 (92.9%)	22 (95.7%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)

	HPV 56		HPV 58		HPV 59	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
ungespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ungespliced -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ungespliced -> NN	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)
gespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> NN	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)
NN -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> gespliced	0 (0.0%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)
NN -> NN	28 (100.0%)	22 (95.7%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	27 (96.4%)	21 (91.3%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)

	HPV 66		HPV 68	
	LLETZ	lesion only	LLETZ	lesion only
ungespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ungespliced -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
ungespliced -> NN	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
gespliced -> NN	0 (0.0%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> ungespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> gespliced	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
NN -> NN	28 (100.0%)	22 (95.7%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)
Total	28 (100.0%)	23 (100.0%)	28 (100.0%)	23 (100.0%)

**Tabelle 4.11 (fortlaufend) Verlauf der biologischen Aktivität eines jeden der 14 HPV-Subtypen in Abhängigkeit von der OP-Methode im Zeitraum zwischen der Operation und 6 Monate postoperativ**

Ein inaktiver status idem (ungespliced→ungespliced), bei dem das Virus nach 6 Monaten weiterhin nachweisbar war, aber inaktiv blieb, wurde in der lesion only Gruppe beim HPV-Subtypen 51 detektiert.

Eine Progression von einer inaktiven in eine aktive Form 6 Monate postoperativ (ungespliced→gespliced) konnte bei einem Abstrich (4,35%) mit dem HPV Subtypen 31 in der lesion only Gruppe nachgewiesen werden.

Eine Eradikation aus einer inaktiven Form 6 Monate postoperativ (ungespliced→NN) war bei 5 HPV-Subtypen in der OP-Methode nach LLETZ (HPV 31, 33, 52; zweimal bei HPV 45) und bei 4 HPV-Subtypen (HPV 16, 18, 39, 59) der OP-Methode nach lesion only feststellbar.

Bei dem HPV-Subtypen 31 ging zum Zeitpunkt der Operation nach der lesion only Gruppe aus einer aktiven Form eine inaktive Form hervor (gespliced→ungespliced).

Ein biologisch aktiver status idem (gespliced→ gespliced) war bei dem HPV-Subtypen 16 zu beobachten: dreimal bei der LLETZ Gruppe und zweimal bei der lesion only Gruppe.

Dass aus einem aktiven Splicing Produkt nach 6 Monaten kein Hinweis auf Vorhandensein eines HPV-Subtypen vorlag (gespliced→NN), wurde in der LLETZ Gruppe bei 23 HPV-Subtypen (HPV 16: 18 mal; HPV 33, 45, 51, 52, 59:

jeweils einmal) und in der lesion only Gruppe bei 15 HPV-Subtypen (HPV 16: 10 mal; HPV 31: zweimal; HPV 33, 52, 66: jeweils einmal) nachgewiesen.

Bei 3 HPV-Subtypen wurde aus einer zuvor nicht nachweisbaren HPV-Virusinfektion eine inaktive Form (NN→ungespliced): 2 HPV-Subtypen waren zuvor in der LLETZ Gruppe detektiert worden (HPV 45 und 35) und ein HPV-Subtyp in der lesion only Gruppe (HPV 16).

5 HPV-Subtypen hatten zum Zeitpunkt der Operation nachweislich keine Splicing Aktivität. Der Abstrich für die Kontrolluntersuchung nach 6 Monaten ergab aktives Splicing (NN→gespliced) bei 4 HPV-Subtypen der lesion only Gruppe (HPV 16, 45, 56, 59) und bei einem HPV-Subtypen nach der herkömmlichen OP-Methode nach LLETZ (HPV 39).

Wenn weder intraoperativ noch 6 Monate postoperativ eine onkogene Aktivität der Onkoproteine E6/E7 festgestellt werden konnte, wurde die Analyse als NN→NN bezeichnet.

Die HPV-Subtypen 58 und 68 kamen in dem eingeschlossenen Patientenkollektiv nie vor.

## **5 Diskussion**

Nach den aktuellen Leitlinien ist bei nicht-schwangeren Patientinnen mit einer CIN III eine Konisation indiziert. Die Konisation nach LLETZ (Large Loop Excision of the Transformation Zone) umfasst laut Definition zusätzlich zur Läsion die Resektion der Transformationszone.

Durch eine Konisation erhöht sich das Risiko der Frühgeburtlichkeit bei folgenden Schwangerschaften signifikant.

Zwischen der Größe des resezierten Konus und dem Risiko einer Frühgeburtlichkeit besteht eine enge Korrelation.

In dieser prospektiv-randomisierten Multizenter-Studie an 14 deutschen Dysplasiezentren wurden 120 Patientinnen mit CIN III und positivem high-risk-HPV-Test zwei Operationsmethoden im Verhältnis 1:1 zugeteilt. Die gezielte Resektion lediglich der kolposkopisch auffälligen Läsion (lesion only) wird der herkömmlichen Hochfrequenzschlingenkonisation (= Resektion der Läsion unter Mitnahme der Transformationszone) gegenübergestellt. Primäres Zielkriterium ist ein negativer high-risk-HPV-Test nach 6 Monaten. Die lesion only Methode wird im Falle einer maximal 5% höher gelegenen HPV Rate als nicht unterlegen angesehen.

Prä- und postoperativ wurden HPV-Genotypisierungen durchgeführt und zusätzlich bei einer Subgruppe von 51 Patientinnen die Transkriptionsaktivität der E6/E7 Onkoproteine bestimmt. Mithilfe der Genotypisierung und der Nachweise der transkriptionellen Aktivität soll eine präzisere Aussage hinsichtlich der biologischen Aktivität der Infektion und der Persistenz, Progression oder Regression einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie ermöglicht werden.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist zu analysieren, ob die Durchführung eines gewebeschonenderen Verfahrens, bei der ausschließlich die Läsion reseziert wird, im Vergleich zu der radikaleren operativen Methode, bei der die Transformationszone reseziert wird, ein nicht unterlegenes onkologisches Outcome erzielt.

### **5.1 Primäres Zielkriterium: HPV-Nachweis prä- und postoperativ**

Das primäre Zielkriterium ist die Rate negativer high-risk-HPV-Tests nach 6 Monaten, da ein negativer HPV-Test allgemein als Beleg für eine erfolgreiche Behandlung angesehen wird, das heißt eine CIN-Persistenz oder ein Rezidiv kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Ein anhaltend positiver HPV-Test kann als Hinweis für ein Fortbestehen der Dysplasie bzw. als Indikator einer wiederkehrenden Dysplasie gewertet werden.

Die Gruppe, die nach der herkömmlichen Methode operiert wurde (LLETZ) zeigte nach 6 Monaten eine Abnahme der high-risk positiven Patientinnen von präoperativ 100% auf 22% und nach 12 Monaten eine weitere Abnahme auf 12%.

Die modifizierte OP-Methode (lesion only) zeigte einen Abfall von 100% auf 20% 6 Monate postoperativ und weiterhin einen Abfall auf 8% 12 Monate postoperativ.

Anhand dieser Berechnungen war keine Unterlegenheit der modifizierten OP-Methode festzustellen. Beide OP-Methoden erzielten ein ähnliches Ergebnis der Rate an negativen high-risk-HPV-Tests nach 6 Monaten.

Aufgrund des kleinen Studienkollektivs lässt sich hierbei jedoch kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen ermitteln.

Die meisten Studien untersuchten den HPV-Status in bestimmten Zeiträumen nach der Intervention einer klassischen LLETZ Methode.

Die HPV Rate 6 Monate postoperativ entspricht den hierzu publizierten Daten in der Literatur: Herfs et al. untersuchte nach 6 Monaten postoperativ den HPV-Status von Patientinnen mit zervikalen Dysplasien. Die intraoperative histologische Auswertung ergab in 25% eine CIN II/III und 75% eine CIN I. Postoperativ hatten 24,4% (32/131) der Patientinnen einen positiven high-risk-HPV-Nachweis [159].

6 Monate postoperativ hatten in der Studie von Trope et al. 30,8 % der Patientinnen ein positiven high-risk-HPV DNA Test [160].

Verantwortlich für einen Behandlungsmisserfolg war in der Studie von Bae et al. vor allem die postoperative Persistenz von HPV bei 35% der Patientinnen, gefolgt vom Alter der Patientin, Befall der Resektionsränder und Schweregrad der initialen CIN Läsion [161].

Auch 12 Monate postoperativ stimmen die Ergebnisse der HPV-Tests dieser Studie mit den publizierten Daten überein. Zum Beispiel erzielte die Studie von Bollen et al. in 88% der Patienten eine Eradikation des HPV-Virus nach einer operativen Intervention bei einer CIN [133].

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Studie und der publizierten Daten stimmen die postinterventionellen HPV-Test Ergebnisse weitestgehend überein.

## **5.2 Sekundäre Zielkriterien: Zytologie und Histologie prä- und postoperativ**

Die zytologische Untersuchung ist ein routinemäßiges Vorgehen im Rahmen der Früherkennung und der Nachsorge von zervikalen Dysplasien. Patientinnen mit auffälliger Zytologie erhalten eine Kolposkopie mit anschließender Zervixbiopsie.

Verglichen mit der modifizierten OP-Methode (62%) hatten nach 6 Monaten bereits 70% der Patientinnen, die nach der herkömmlichen Methode operiert wurden einen unauffälligen Pap-Abstrich, wohingegen nach 12 Monaten die Patientinnen der lesion only Gruppe mit 87% häufiger als die LLETZ Gruppe mit 73% einen unauffälligen Abstrich nachwiesen.

Patientinnen mit einer histologisch gesicherten CIN III Läsion werden gemäß den Leitlinien durch eine Konisation therapiert. Diese Studie setzte präoperativ eine CIN III-Läsion voraus. Im Rahmen der histopathologischen Beurteilung des Resektats war bereits bei insgesamt 4 Patientinnen keine Dysplasie mehr nachweisbar, obwohl präoperativ bioptisch eine CIN III diagnostiziert wurde. Die lesion only Gruppe hatte intraoperativ 12 Patientinnen mit Regression einer CIN III-Läsion. Ohne chirurgische Intervention hatten bereits 16 Patientinnen eine spontane Regression.



Im kurzen Intervall 6 Monate nach der Konisation waren die histologischen Ergebnisse bei der OP-Methoden in etwa vergleichbar (lesion only: 88%, LLETZ: 86%).

Nach 12 Monaten schnitt die radikalere OP-Methode nach LLETZ (90% der Patientinnen) besser ab als lesion only (84% der Patientinnen waren dysplasiefrei).

Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs ließ sich jedoch auch hier kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf der histologischen Ergebnisse herstellen.

### **5.3 Weitere Vergleichsparameter**

#### **5.3.1 Resektionsränder**

Die Beurteilung der Resektionsränder wird im Rahmen der regulären histopathologischen Untersuchung durchgeführt.

Hierbei erreichte die OP-Methode nach LLETZ bei 46 Patientinnen (92%) und bei der OP-Methode nach lesion only bei 39 Patientinnen (80%) freie Resektionsränder (in sano).

Die in der Literatur beschriebene Rate an positiven Resektionsrändern liegt zwischen 21,1 - 36 %, so dass hier beide OP-Methoden ein vergleichbares Ergebnis erzielen [151, 161].

Die Beurteilung und der Vergleich mit anderen Studien sind jedoch schwierig, da die jeweilige Radikalität der Operationsmethode in den einzelnen Studien häufig nicht klar definiert ist.

Hinzu kommt, dass eine Unterscheidung zwischen ektozervikalen und endozervikalen Befallsmuster berücksichtigt werden sollte, da ein endozervikaler Befall mit einem höheren Rezidivrisiko vergesellschaftet ist als ein ektozervikaler Befall.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass eventuell verbliebenes dysplastisches Gewebe im Rahmen der Fulgurisation zerstört wird, so dass

trotz positiver Resektionsränder eine komplette Zerstörung der Dysplasie vorliegt.

Zusammengefasst ist bei der lesion only Methode zwar mit einer höheren Rate an non in sano Resektion zu rechnen, die jedoch immer noch vergleichbar mit international publizierten Ergebnissen liegt.

### **5.3.2 Konusvolumina**

Für die Therapie einer hochgradigen Dysplasie wird seit vielen Jahren die Schlingenkonisation, z.B. LEEP favorisiert, da weniger Gewebe entfernt wird und postoperative Komplikationen, wie Blutungen und Infektionen, seltener auftreten [126].

In vielen Studien wurde eine Korrelation zwischen der Größe des Konusvolumens und dem Risiko einer Früh- bzw. Fehlgeburt beschrieben [126, 137, 162, 163]. Diese Arbeit vergleicht das Konusvolumen des gewebeschonenderen Verfahrens (lesion only) mit der Entfernung der kompletten Transformationszone (LLETZ). Die Volumenmessung des Präparates erfolgte intraoperativ nach dem Archimedes Prinzip.

In der vorliegenden Studie wurde nach der lesion only OP-Methode ein Mittelwert von 1,02 ml und nach der klassischen LLETZ OP-Methode ein mittleres Konusvolumen von 1,97 ml berechnet.

Die Studie von Song et al. untersuchte die Regenerationsfähigkeit der Cervix uteri nach einer Konisation. Dabei wurde das Konusvolumen ebenfalls nach dem Archimedes Prinzip gemessen und die durchschnittlichen Volumina nach der herkömmlichen Konisation lag bei  $4.0 \pm 1.1 \text{ cm}^3$  [164].

Wie hoch das Risiko einer Frühgeburtslichkeit nach einer Konisation ist, veranschaulichte die Studie von Kyrgiou et al., die im Durchschnitt ein Konusvolumen von  $2.6 \pm 1.3 \text{ cm}^3$  im Bereich von  $0.6\text{-}8.0 \text{ cm}^3$  resezierten. Je größer das Konusvolumen und die Konuslänge der Resektate ausfielen, desto eher erlitten die Patientinnen eine Frühgeburt [165].

Im Vergleich zu den publizierten durchschnittlichen Konusvolumina fielen selbst die Konusvolumina der radikaleren OP-Methode (LLETZ) in dieser vorliegenden Studie kleiner aus.

Wie auch bei der Analyse der Resektionsränder, ist die Größe bzw. das Volumen der entnommenen Konisate eine individuelle Herangehensweise des Operateurs. Der durchschnittliche Mittelwert des Konusvolumens der LLETZ Gruppe betrug in München 1,78 ml, in Hannover 3,18 ml und in Kiel 2,32 ml. Im Vergleich dazu waren die Durchschnittswerte der Konusvolumina der lesion only Gruppe in München 0,98 ml, in Hannover 1,85 ml und in Kiel 0,65 ml.

Das Ausmaß der operativen Radikalität ist stark vom Operateur abhängig. Bei kleinen und gut ein sichtbaren Läsionen wurde von vornherein nur die Läsion entfernt, wohingegen andere Operateure trotzdem die Läsion unter Mitnahme der Transformationszone anstrebten.

Hinzu kommt, dass mit der Randomisierung in eine der beiden OP-Methoden, Patientinnen trotz ausgeprägtem Befall die modifizierte OP-Methode nach lesion only erhielten.

Eine Lösung für junge Frauen mit Kinderwunsch könnte die in der von Kyrgiou et al. beschriebene präoperative Vermessung der Zervix mit der exakten Erfassung der Proportionen der Patientin darstellen, um gewebeschonend und trotzdem onkologisch sicher eine Dysplasie zu therapieren [165].

## **5.4 Molekularbiologische Zusatzuntersuchungen**

### **5.4.1 Genotypisierung**

#### **5.4.1.1 Prävalenz und Vergleich der HPV-Subtypen intra- und postoperativ**

Gerade im Hinblick auf die Entwicklung eines prophylaktischen Impfstoffes ist ein exaktes Verständnis der Prävalenz von HPV-Subtypen in der Bevölkerung von großer Bedeutung.

Die Häufigkeitsverteilung der HPV-Subtypen im Patientenkollektiv dieser Studie ist nicht auf die Normalbevölkerung übertragbar, da die Einschlusskriterien dieser Studie eine CIN III Läsion und einen positiven high-risk-HPV-Test

voraussetzten. Aus diesem Grund ist in dieser Studie im Vergleich zur Normalbevölkerung von einer erhöhten Belastung von high-risk-HPV-Subtypen auszugehen.

Mit 49% kam der HPV-Subtyp 16 intraoperativ mit Abstand am häufigsten vor, gefolgt von dem HPV-Subtypen 31 mit 10% und dem HPV-Subtypen 59 mit 7%. Nach operativer Intervention war der HPV-Subtyp 16 weiterhin in den beiden Nachsorgeuntersuchungen der mit Abstand häufigste HPV-Subtyp. 6 Monate postoperativ war am zweithäufigsten der HPV-Subtyp 31 und 59, gefolgt von HPV 56. Nach 12 Monaten war der HPV-Subtyp 59 weiterhin an zweiter Stelle, gefolgt von dem HPV-Subtyp 39. Die vorliegende Verteilung mit HPV 16 als Hauptverursacher entspricht dem in der Literatur beschriebenen Prävalenzmuster:

Vor dem therapeutischen Eingriff hatten in einer Studie von Kocken et al. 93% der 430 eingeschlossenen Patientinnen einen positiven high-risk-HPV-Test. Auch hier war der HPV-Subtyp 16 mit 64% der häufigste Subtyp im Kollektiv, gefolgt von HPV 31 (9%), HPV 33 (11%) und HPV 18 (9%). Unter dem high-risk-HPV positiven Kollektiv hatten 85% eine Einfachinfektion, 14% eine Infektion mit zwei Subtypen und 2% eine Dreifachinfektion mit HPV-Subtypen [166].

In einer Studie von Klug et al. aus Hannover und Tübingen hatten Frauen mit schwerwiegenden Dysplasien (CIN II und CIN III) ebenfalls am häufigsten eine Infektion mit dem HPV-Subtypen 16, gefolgt von HPV 45, 58 und 52 [167].

Auch in der Studie von Kraus et al. war der HPV-Subtyp 16 am häufigsten nachweisbar. Danach folgten nach ihrer Häufigkeit HPV 31, 33, 18, 45, 52, 58 [168].

Die Häufigkeitsverteilung der Studie von Cattani et al. ergab ebenfalls den HPV-Subtypen 16 mit 47,1 % an der Spitze, gefolgt von HPV 18 (13,4%), HPV 31 (8,1%) und HPV 33 (6,7%). In 24,6% der Fälle lag eine Mehrfachinfektion vor [110].

Mehrfachinfektionen, die meistens aus zwei Subtypen, seltener zwischen drei bis sieben HPV-Subtypen enthielten, wurden in der Studie von Venturoli et al. in 58,3% der Abstriche und Einfachinfektionen mit einem HPV-Subtypen in 41,7%

der Fälle gefunden. Auch in dieser Studie war der HPV-Subtyp 16 mit 55,6% am häufigsten nachweisbar, gefolgt von HPV-Subtyp 31 (19,4%), 51 und 58 (jeweils 15,3%) [169].

In dieser Auswertung war die Mehrfachinfektion mit zwei Subtypen in einer Probe am häufigsten. Infektion mit einem HPV-Subtypen kam in 45 % der Fälle und die Mehrfachinfektion in 33% der Fälle vor.

Da in dieser Studie nur Patientinnen mit hohem Dysplasiegrad eingeschlossen wurden, fiel die Berechnung der Rate an Mehrfachinfektionen im Vergleich zu anderen Studien höher aus.

#### **5.4.1.2 Korrelation zwischen HPV-Persistenz, auffälliger Zytologie postoperativ und dem vorbestehenden HPV-Subtypen**

Eine HPV-Infektion mit einem oder mehreren high-risk-HPV-Subtypen muss nicht unbedingt zu einer schweren Dysplasie führen, aber gilt dennoch als Voraussetzung für die Entwicklung der meisten Zervixkarzinome.

Vor allem junge Patientinnen weisen häufig multiple Infektionen mit unterschiedlichen HPV-Subtypen auf (vergleiche Punkt 5.1).

Mithilfe der Genotypisierung kann in dieser Auswertung untersucht werden, bei welchem HPV-Subtypen am ehesten mit einer Persistenz und damit einem erhöhten Risiko der Entstehung eines Zervixkarzinoms zu rechnen ist.

Die Auswahl der Primer war auf 14 HPV-Subtypen begrenzt, sodass eventuell andere nicht untersuchte HPV-Subtypen für die Progression bzw. Persistenz verantwortlich sein könnten.

Außerdem wurde bei der Auswertung keine Mehrfachinfektion von HPV-Subtypen berücksichtigt, sondern jeder HPV-Subtyp einzeln auf die postoperativen klinischen Befunde analysiert.

Auch in dieser Studie ist klar ersichtlich, dass der HPV-Subtyp 16 mit Abstand am häufigsten für pathologische Befunde in postoperativen Nachsorgeuntersuchungen verantwortlich ist. 32% (30/95) der Patientinnen hatten 6 Monate postoperativ weiterhin einen positiven high-risk-HPV-Test,

darunter waren 10 Patientinnen mit HPV 16 infiziert. Der zytologische postoperative Kontrollabstrich ergab bei der persistierenden Infektion mit dem HPV-Subtyp 16 häufiger Auffälligkeiten als bei anderen HPV-Subtypen: zwei von drei Patientinnen mit einem Pap IVa-p Abstrich hatten eine Infektion mit dem HPV-Subtyp 16.

In einer Studie aus Italien wurde gezeigt, dass vor allem der HPV-Subtyp 16 und/oder 18 trotz Konisation das Risiko der Progression in ein Zervixkarzinom erhöht [169].

Auch Soderlund-Strand et al. erkannte in einer Studie, dass vor allem Patientinnen mit einer CIN III Läsion mit den HPV-Subtypen 16, 31 und 33 infiziert waren [170].

Vor allem der HPV-Subtyp 16 korreliert stark mit einem hohen Risiko an postoperativen Resistenzen und Rezidiven [171]. Mit dem Wissen, dass die Infektion mit dem HPV-Subtyp 16 postoperativ zur Progression neigt, sollte überlegt werden, die Nachsorge dieser Patientinnen engmaschiger durchzuführen, um frühzeitig ein Rezidiv zu erkennen.

#### **5.4.1.3 Vergleich der beiden OP-Methoden hinsichtlich des Einflusses chirurgischer Intervention an der Cervix uteri auf die Prävalenz der HPV-Genotypen intra- und postoperativ (t=6M)**

Im Folgenden soll anhand der Detektion der 14 verschiedenen HPV-Subtypen Rückschlüsse auf den Verlauf einer Infektion nach Intervention der beiden OP-Methoden geschlossen werden.

Die einzelnen HPV-Subtypen wurden in einem Zeitraum von 6 Monaten hinsichtlich Status idem gesund, Neuinfektion, Eradikation und Persistenz in Abhängigkeit von der OP-Methode untersucht.

Venturoli et al. analysierte in seiner Studie ebenfalls 6 Monate postoperativ den Verlauf einer HPV-Infektion. Bei 48,6% der Patientinnen wurde das Virus eradiziert, bei 22,2% der Patientinnen persistierten alle zuvor nachgewiesenen HPV-Genotypen und bei 29,2% persistierte mindestens ein HPV-Genotyp. Auch in dieser Studie war der HPV-Subtyp 16 bei 46% der Patientinnen

hauptverantwortlich für eine Viruspersistenz. Die anderen HPV-Subtypen lagen hinsichtlich der HPV-Persistenz zwischen 2,7 und 16,2% [169].

Diese Untersuchung wertete den Verlauf der HPV-Genotypen in einem Zeitraum von 6 Monaten aus. Für die Beseitigung des Virus wurde in Studien ein Zeitraum von mindestens 8 Monaten beobachtet. Eine Studie ergab nach 12 Monaten eine Eradikation von 70% und nach 24 Monaten eine Eradikation des Virus von 91% [69, 172].

Bis sich eine CIN III Läsion rückgebildet hat, benötigt es mehrere Monate. Zudem kommt eine Spontanremission nur selten vor. Motamedi et al. untersuchte dies in seiner Studie und erkannte, dass eine Rückbildung einer CIN III Läsion eher bei jüngeren Patientinnen (<30 Jahre) ohne Infektion mit dem HPV-Subtypen 16 vorkam [173].

Aufgrund der geringen Patientenzahl und des kurzen Beobachtungszeitraums zeigte sich auch in anderen Studien eine Überschätzung der Regressionsrate. Aufgrund dessen sind in zukünftigen Studien längere Zeiträume besser gewählt. Hinzu kommt, dass im Rahmen von Nachsorgeuntersuchungen Biopsien durchgeführt werden, die mit Hilfe des Wundheilungsprozesses eine immunologische Stimulation bewirken können und es folglich nach einem länger gewählten Zeitraum zur Regression kommt [173].

Eine Persistenz mit demselben HPV Subtypen nach einer Konisation ergab in der Studie von Bae et al. ein statistisch signifikantes ( $p < 0.0001$ ) erhöhtes Risiko für ein CIN Rezidiv [140], deshalb sollten Patientinnen mit derselben Konstellation über einen langen Zeitraum nachuntersucht werden.

#### **5.4.2 Transkriptionsaktivität**

##### **5.4.2.1 Vergleich der intra- und postoperativen (t=6M) Dynamik der Dysplasie in Abhängigkeit von der transkriptionellen Aktivität**

Das onkogene Potential der high-risk-HPV-Typen resultiert aus der Interaktion der Onkoproteine E6 und E7 mit den Tumorsuppressorproteinen p53 und pRb. Mithilfe des Nachweises der transkriptionellen Aktivität von E6 und E7 kann im

Gegensatz zum bloßen Nachweis von HPV DNA die biologische Aktivität der Infektion ermittelt werden. Wie sich die biologische Aktivität auf die morphologischen Befunde auswirkte, war Gegenstand dieser Auswertung. Dafür wurden sowohl intra- als auch postoperativ (t=6M) histologische und zytologische Befunde erhoben.

Für die Studie wurden nur Patientinnen zugelassen, die präoperativ einen positiven high-risk-HPV-Test und eine histologisch gesicherte CIN III hatten. Aufgrund dieser Einschlusskriterien lässt sich die mehrheitlich auffälligen zytologischen Befunde kurz vor der Konisation erklären.

Diese Auswertung verdeutlicht den starken Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Splicing und dem Nachweis eines positiven high-risk-HPV-Tests. Intraoperativ waren alle 51 Patientinnen high-risk-HPV positiv (100%), davon wiesen 38 Splicing-Produkte auf und 13 Patientinnen kein Splicing auf. Umgekehrt verhielt es sich bei der Nachsorgeuntersuchung 6 Monate postoperativ. 78% der Patientinnen waren high-risk-HPV negativ, davon hatten 36 Patientinnen kein Splicing-Nachweis und 4 Patientinnen waren mit Splicing-Nachweis.

Patientinnen mit negativem HPV-Test hatten in 3 % der Fälle einen positiven Transkript-Nachweis. 84% der DNA-positiven Frauen hatten einen positiven Nachweis einer transkriptionellen Aktivität, die aber die beiden HPV-Subtypen 16 und 18 ausschloss. In Einzeluntersuchungen ergab die Infektion mit dem HPV-Subtypen 18 in 86% der Patientinnen und bei HPV 16 in 91% der Patientinnen eine nachweisbare Onkogenaktivität [109].

Den Zusammenhang zwischen zytologischen Befunden und dem Nachweis der Expression von E6/E7 Onkogenen untersuchte Castle et al. in seiner Studie, die bei zytologisch unauffälligen Befunden in 8% der Fälle, bei ASC in 43% der Fälle, bei LSIL in 71% der Fälle und bei 87% mit Diagnose einer HSIL eine positive transkriptionelle Aktivität zeigte [109].

Der prozentuale Anteil an positiven E6/E7-Transkripten betrug in der Studie von Castle et al. 40% bei negativem oder nicht durchgeführtem histologischen Ergebnis, 70% bei CIN I, 90% bei CIN II und 94% bei CIN III [109].



Sotlar et al. untersuchte die Zusammenhänge zwischen dem Nachweis der Onkogene E6/E7 und den histologischen Befunden. Die Nachweisrate von mRNA lag bei CIN 0 bei 33.8% (27/80), bei einer CIN I Läsion 76.1% (35/46), 90.0% (54/60) bei einer CIN II und 95.3% (41/43) bei einer CIN III Läsion [108].

Kraus et al. analysierte ebenfalls den Einfluss der transkriptionellen Aktivität auf das histopathologische Ergebnis. 92% der Patientinnen mit CIN III und 53% der Patientinnen mit CIN II wiesen E6/E7-Expression nach. Bei Patientinnen mit CIN I wurde keine transkriptionelle Aktivität gefunden. Von 11 Patientinnen ohne Dysplasie hatten 2 einen positiven Transkript-Nachweis. Hierbei wurden nur die HPV-Subtypen 16, 18, 31, 33 und 45 ausgewertet [168].

Der Grad der Dysplasie korreliert nicht immer mit dem Nachweis onkogener Aktivität. Das kann zum einem darin begründet sein, dass das Virus zwar aktiv ist, aber morphologisch noch nicht auffällig wurde oder die Läsion sogar an einem anderem Ort der Cervix uteri lokalisiert ist [168].

Die Studie von Persson et al. kritisierte die Testung von E6/E7-Expression aufgrund der niedrigen Sensitivität trotz hoher Spezifität als Prognosemarker nach einer Konisation. In 100% der Patientinnen mit Rezidiv einer fortgeschrittenen Dysplasie wurde postoperativ high-risk-HPV-DNA detektiert [151].

Zusammenfassend lässt sich in dieser Auswertung eine Korrelation zwischen der Prävalenz von E6/E7-Splicing-Transkripten und den unterschiedlichen Schweregraden der morphologischen Befunde erschließen. Da mit Hilfe einer RT-PCR selbst in nichtdysplastischem Epithel oder in CIN I Läsionen E6/E7-Transkripte detektiert werden können, könnte die Detektion von E6/E7 als ein spezifischerer Prognosemarker für die Beurteilung einer Progression dienen [110].

Zudem könnten mit dem Wissen der engen Korrelation zwischen E6/E7-Expression und der damit verbundenen genomischen Instabilität bis zur Entstehung von Krebs zukünftig neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten gewonnen werden [174].

#### **5.4.2.2 Vergleich der beiden OP-Methoden hinsichtlich des Einflusses chirurgischer Intervention an der Cervix uteri auf die biologische Aktivität der Onkoproteine E6/E7 intra- und postoperativ (t=6M)**

Aktuell gibt es noch keine vergleichenden Studien, die sich mit dem detaillierten Verlauf einer biologischen Aktivität von Onkoproteinen nach einem chirurgischen Eingriff beschäftigen.

Da im Zervixkarzinom fast immer transkriptionell aktive Onkoproteine nachweisbar sind und die Onkogenese erheblich beeinflussen [5], ist es von großer Relevanz die onkologische Sicherheit der beiden OP-Methoden anhand der biologischen Aktivität der beiden Onkoproteine E6/E7 zu vergleichen.

Die Onkoproteine E6/E7 beeinflussen den Prozess einer Infektion, indem sie die Kontrollpunkte des Zellzyklus umgehen, die Apoptose hemmen und die Länge der Telomere unverändert lassen. Daraus resultiert eine chromosomale Instabilität, die zur Immortalisierung und Hyperproliferation der Zelle führt [175].

Diese Auswertung soll den Einfluss der beiden chirurgischen Interventionen auf die transkriptionelle Aktivität der Onkoproteine E6/E7 und damit die Entstehung und den Verlauf von Dysplasien an der Cervix uteri verdeutlichen.

Die konkrete Frage dieser Untersuchung lautet: Inwieweit beeinflusst die jeweilige OP-Methode die biologische Aktivität des Virus und somit die onkologische Sicherheit?

In Zusammenschau der gesamten transkriptionellen Verläufe stellte sich heraus, dass in der lesion only Gruppe das Virus schwieriger zu eradizieren war und häufiger persistierte, wenn auch in einer inaktiven (ungespliced) Form.

Die Persistenz einer inaktiven Infektion (ungespliced → ungespliced) wurde bei dem HPV-Subtypen 51 in der lesion only Gruppe entdeckt. Die aktive Persistenz (gespliced → gespliced) ließ sich bei dem HPV-Subtypen 16 nachweisen (LLETZ: dreimal; lesion only: zweimal).

Wie in vielen Studien beschrieben, war auch in dieser Studie der HPV-Subtyp 16 am schwierigsten zu eradizieren (vergleiche Punkt 5.4.2.1)

Dass sich das Virus innerhalb von 6 Monaten von einer aktiven in eine inaktive Form (gespliced→ungespliced) entwickelt, wurde in der lesion only Gruppe bei dem HPV-Subtypen 31 detektiert.

In einer Multizenterstudie aus Heidelberg wurden in 835 Abstrichen die Integration von HPV 16, 18, 31, 33 und 45 untersucht, die aufgrund von chromosomaler Instabilität durch die Onkoproteine erfolgt. Vor allem HPV 16, 18 und 45 führten eher zu einer chromosomalen Instabilität als die HPV Subtypen 31 und 33 [176].

Nachteil dieser Auswertung ist, dass die transkriptionelle Aktivität der Onkoproteine mit dem Nachweis einer Einfach-HPV-DNA-Infektion verglichen wurde. Vermutlich spielt eine Mehrfach-HPV-DNA-Infektion hinsichtlich der Progression zum Zervixkarzinom eine viel gravierendere Rolle.

Trotz wiederholter Versuche mit neuen Primern konnte bei manchen HPV-Subtypen keine RNA-Transkripte nachgewiesen werden. Dies lässt sich aufgrund eines episomalen Status des Virus erklären, indem der Vorgang der Transkription noch effektiv reguliert wird und das Virus gleichzeitig spontan beseitigt ist [110].

Die biologische Aktivität der Onkoproteine wurde nur in einem kurzen Zeitrahmen nachverfolgt. Einige Studien erachten es als sinnvoll mindestens 12 Monate den Einfluss der Onkoproteine E6/E7 zu beobachten.

Eine Stärke dieser Studie ist die exakte Beurteilbarkeit der Auswirkungen eines jeden einzelnen HPV-Subtypen im Zeitraum zwischen Konisation und der Kontrolluntersuchung nach 6 Monaten.

Für circa 100 verschiedene HPV-Subtypen existiert bislang eine Beschreibung des gesamten Genoms [44]. Zhang et al. gelang es innerhalb jedes HPV-Genotypen Unterschiede der einzelnen Onkoproteine nach der Behandlung mit LEEP zu untersuchen. Zum Beispiel schien die E6 Variante mit der Wahrscheinlichkeit der Eradikation des Virus nach einer LEEP zu korrelieren. Die asiatische Variante von HPV 16 hing stark mit der Entwicklung einer HSIL zusammen, wohingegen das europäische E6 Onkoprotein (T350G/A442C) das Risiko einer Resistenz und eines Rezidivs einer HPV16-Infektion erhöht.

Varianten des E7 Gens hatten keine negative Auswirkung auf den Verlauf einer HPV16-Infektion [175].

Auch in der Studie von Sotlar et al. wurde der Bestimmung der transkriptionellen Aktivität des Onkoproteins E6 für den Verlauf einer zervikalen Läsion eine zentrale Rolle zugeteilt. Die Spezifität eines HPV-DNA-Tests für onkogene Hochrisikogruppen mit dem gleichzeitigen Nachweis einer transkriptionellen Aktivität für E6 kann dadurch signifikant ( $P < 0.0001$ ) erhöht werden [108].

Die Expression von E6/E7 war nicht nur in fortgeschrittenen Dysplasien nachweisbar, sondern auch in morphologisch unauffälligen Befunden detektierbar (vergleiche Punkt 4.5.2.1).

Entweder ist das Virus noch aktiv und Zellveränderungen haben noch nicht stattgefunden oder das Virus wurde nicht vollständig eradiziert.

In vielen Studien gilt der Nachweis von E6/E7-Onkogentranskripten als früher Marker für eine Viruspersistenz, die folglich schwere Dysplasien verursachen kann [110].

## 6 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Humane Papillomaviren (HPV) haben eine große Bedeutung bei der Entstehung von Dysplasien und invasiven Karzinomen der Zervix.

Bei nicht schwangeren Patientinnen mit einer CIN III Läsion ist gemäß den aktuell gültigen Leitlinien die Indikation zur Konisation gestellt. Entsprechend der Definition der LLETZ (large loop excision of the transformation zone) wird bei der herkömmlichen Konisation zusätzlich zur Läsion die Transformationszone mitentfernt.

Eine Reduktion der Konusgröße reduziert nachweislich das Frühgeburtlichkeitsrisiko. Da zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar ist, ob eine Rücknahme der operativen Radikalität eine ebenso hohe onkologische Sicherheit garantiert oder ob dafür die Mitnahme der Transformationszone essentiell ist, soll diese Fragestellung in der vorliegenden Studie untersucht werden.

**Methode:** In dieser prospektiven Multizenter-Studie wurden 120 Patientinnen morphologisch und davon eine Untergruppe von 51 Patientinnen molekularbiologisch untersucht, die aufgrund einer CIN III im Zeitraum von 2014 bis 2017 eine Konisation erhielten.

Die Patientinnen wurden präoperativ im Verhältnis 1:1 zwei Operationsmethoden zugeteilt:

Die gezielte Resektion lediglich der kolposkopisch auffälligen Läsion (lesion only) wurde der herkömmlichen Hochfrequenzschlingenkonisation (= Resektion der Läsion unter Mitnahme der Transformationszone, LLETZ) gegenübergestellt.

Im Anschluss an die Konisation wurde das Konus-Präparat nach Ermittlung der Konusgröße histologisch untersucht und hinsichtlich des Dysplasiegrads sowie der Resektionsränder durch den Pathologen beurteilt.

Im Abstand von 6 und 12 Monaten postoperativ wurden die Patientinnen in der Dysplasiesprechstunde untersucht, um den Pap-Abstrich, den HPV Status sowie den histologisch und kolposkopischen Befund zu erheben.

Um eine präzisere Aussage bezüglich der klinischen Konsequenz einer HPV Infektion treffen zu können, wurde zusätzlich zur Genotypisierung der Nachweis der transkriptionellen Aktivität der Onkoproteine E6 und E7 intra- und postoperativ bestimmt.

**Ergebnisse:** Primäres Zielkriterium war die Rate negativer high-risk-HPV-Tests nach 6 Monaten. Die lesion only Methode wurde im Falle einer maximal 5% höher gelegenen HPV-Rate als nicht unterlegen angesehen. Nach 6 Monaten hatten 78% der Patientinnen mit der klassischen Methode nach LLETZ und 80% der Patientinnen mit der modifizierten OP-Methode (lesion only) ein negatives high-risk-HPV-Testergebnis. Im Beobachtungszeitraum nach 12 Monaten schnitt die OP-Methode nach lesion only mit 92% der Patientinnen im Vergleich zu der herkömmlichen OP-Methode nach LLETZ mit 88% der Patientinnen besser ab. Im intraoperativen Vergleich wurde bei der lesion only Methode fast halb so wenig Gewebe entfernt wie bei der radikaleren Methode (1,02ml versus 1,97ml), die 12% mehr in sano-Resektionen erreichte als die modifizierte Methode (80% versus 92%). Aufgrund der eingeschränkten Rekrutierung wurde die Studie nach 2 Jahren abgebrochen.

**Schlussfolgerung:** Sowohl in der Kontrolle nach 6 als auch nach 12 Monaten schnitt die modifizierte Konisation ohne Mitnahme der Transformationszone im Vergleich mit der klassischen LLETZ mindestens genauso gut in Bezug auf die Rate an negativen HPV-Tests ab. Aufgrund des vorzeitigen Studienabbruchs konnte hier jedoch kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden. Um eine Aussage treffen zu können, ob das gewebeschonendere Verfahren im Vergleich zu der herkömmlichen OP-Methode eine Reduktion der operationsassoziierten Risiken bei vergleichbarem onkologischen Outcome erzielt, bedarf es einer Bestätigung mit einem größeren Patientenkollektiv mit der Intention eine Zielgruppe mit definierter Befundkonstellation festzulegen, die gerade im Hinblick auf zukünftige Schwangerschaften mehr von der modifizierten Konisation als von der herkömmlichen Methode profitiert. Anhand der bisherigen Ergebnisse sollte jedoch insbesondere bei jungen Patientinnen mit Kinderwunsch eine modifizierte Konisation im Aufklärungsgespräch besprochen werden.

## 7 Literatur

- 1 *Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J.* Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses* 2015; 7(7): 3863 – 3890
- 2 *Boyle P, Maisonneuve P, Autier P.* Update on cancer control in women. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2000; 70(2): 263 – 303
- 3 *Zur Hausen H.* Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92(9): 690 – 698
- 4 *Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 1999; 189(1): 12 – 19
- 5 *Zur Hausen H.* Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991; 184(1): 9 – 13
- 6 *Horn L-C, Brambs CE, Handzel R, Mehlhorn G, Schmidt D, Schierle K.* Nomenclature of squamous cell precursor lesions of the lower female genital tract. Current aspects. *Der Pathologe* 2016; 37(6): 526 – 533
- 7 *Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A.* Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 2015; 65(2): 87 – 108
- 8 Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom), 2015.  
<http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Gebaermutterhalskrebs/gebaermutterhalskrebs.html>, 31.07.2017
- 9 *Jones BA, Davey DD.* Quality management in gynecologic cytology using interlaboratory comparison. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2000; 124(5): 672 – 681
- 10 *Herbert A.* Cervical screening: how often should women be screened? *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology* 2000; 11(2): 75 – 81
- 11 *Castle PE, Jeronimo J, Schiffman M et al.* Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer research* 2006; 66(2): 1218 – 1224

- 12 *Quade BJ, Yang A, Wang Y et al.* Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. *Gynecologic oncology* 2001; 80(1): 24 – 29
- 13 *Herfs M, Yamamoto Y, Laury A et al.* A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109(26): 10516 – 10521
- 14 *Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, Arbeit JM.* Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer research* 2000; 60(5): 1267 – 1275
- 15 *Delvenne P, Herman L, Kholod N et al.* Role of hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Molecular and cellular endocrinology* 2007; 264(1-2): 1 – 5
- 16 *Horn L-C, Klostermann K.* Precancerous lesions of the uterine cervix: morphology and molecular pathology. *Der Pathologe* 2011; 32 Suppl 2: 242 – 254
- 17 *Herfs M, Hubert P, Moutschen M, Delvenne P.* Mucosal junctions: open doors to HPV and HIV infections? *Trends in microbiology* 2011; 19(3): 114 – 120
- 18 *Yang EJ, Quick MC, Hanamornroongruang S et al.* Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2015; 28(7): 994 – 1000
- 19 *Moody CA, Laimins LA.* Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews. Cancer* 2010; 10(8): 550 – 560
- 20 *Trunk MJ, Wentzensen N, Knebel Doeberitz M von.* Molecular pathogenesis of cervical cancer and its first steps. *Der Pathologe* 2005; 26(4): 283 – 290
- 21 *Longworth MS, Laimins LA.* Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2004; 68(2): 362 – 372
- 22 *Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF.* Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS pathogens* 2009; 5(2): e1000318



- 
- 23 Lopez J, Ruiz G, Organista-Nava J, Gariglio P, Garcia-Carranca A. Human papillomavirus infections and cancer stem cells of tumors from the uterine cervix. *The open virology journal* 2012; 6: 232 – 240
  - 24 Biryukov J, Meyers C. Papillomavirus Infectious Pathways: A Comparison of Systems. *Viruses* 2015; 7(8): 4303 – 4325
  - 25 Lehman CW, Botchan MR. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(8): 4338 – 4343
  - 26 Bastien N, McBride AA. Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology* 2000; 270(1): 124 – 134
  - 27 Bedell MA, Hudson JB, Golub TR et al. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *Journal of virology* 1991; 65(5): 2254 – 2260
  - 28 Bosch FX, Manos MM, Munoz N et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87(11): 796 – 802
  - 29 Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 1993; 85(12): 958 – 964
  - 30 Munoz N, Bosch FX, Sanjose S de et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *International journal of cancer* 1992; 52(5): 743 – 749
  - 31 Richardson H, Kelsall G, Tellier P et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2003; 12(6): 485 – 490
  - 32 Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet (London, England)* 2007; 370(9590): 890 – 907
  - 33 Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus research* 2002; 89(2): 191 – 199

- 
- 34 *Stanley M.* Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic oncology* 2008; 109(2 Suppl): 21
- 35 *Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Lawson HW, Chesson H, Unger ER.* Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control* 2007; 56(RR-2): 1 – 24
- 36 *Woodman CBJ, Collins SI, Young LS.* The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer* 2007; 7(1): 11 – 22
- 37 *Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM.* Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; 97(14): 1066 – 1071
- 38 *Moreno V, Bosch FX, Munoz N et al.* Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet (London, England)* 2002; 359(9312): 1085 – 1092
- 39 *Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A et al.* Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *International journal of cancer* 2006; 118(6): 1481 – 1495
- 40 *Tolstrup J, Munk C, Thomsen BL et al.* The role of smoking and alcohol intake in the development of high-grade squamous intraepithelial lesions among high-risk HPV-positive women. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 2006; 85(9): 1114 – 1119
- 41 *Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS et al.* Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Scientific reports* 2015; 5: 16865
- 42 *Munger K, Baldwin A, Edwards KM et al.* Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of virology* 2004; 78(21): 11451 – 11460

- 
- 43 *Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Zur Hausen H, Villiers E-M de*. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401(1): 70 – 79
- 44 *Villiers E-M de, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, Zur Hausen H*. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1): 17 – 27
- 45 *Parkin DM, Bray F*. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 3: 11
- 46 *Munoz N, Bosch FX, Sanjose S de et al*. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* 2003; 348(6): 518 – 527
- 47 *Bernard H-U*. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2005; 32 Suppl 1: 6
- 48 *Smith JS, Lindsay L, Hoots B et al*. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International journal of cancer* 2007; 121(3): 621 – 632
- 49 *Zur Hausen H*. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Current topics in microbiology and immunology* 1994; 186: 131 – 156
- 50 *Doorbar J*. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science (London, England : 1979)* 2006; 110(5): 525 – 541
- 51 *Pfister H*. Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 1984; 99: 111 – 181
- 52 *Bergvall M, Melendy T, Archambault J*. The E1 proteins. *Virology* 2013; 445(1-2): 35 – 56
- 53 *McBride AA, Oliveira JG, McPhillips MG*. Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2006; 5(14): 1499 – 1502
- 54 *Bodily J, Laimins LA*. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology* 2011; 19(1): 33 – 39
- 55 *Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C et al*. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *International journal of cancer* 2013; 132(9): 2087 – 2094

- 
- 56 *Middleton K, Peh W, Southern S et al.* Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *Journal of virology* 2003; 77(19): 10186 – 10201
- 57 *Belleudi F, Nanni M, Raffa S, Torrisi MR.* HPV16 E5 deregulates the autophagic process in human keratinocytes. *Oncotarget* 2015; 6(11): 9370 – 9386
- 58 *Munger K, Basile JR, Duensing S et al.* Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20(54): 7888 – 7898
- 59 *Bagchi S, Raychaudhuri P, Nevins JR.* Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 1990; 62(4): 659 – 669
- 60 *Bandara LR, Adamczewski JP, Hunt T, La Thangue NB.* Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature* 1991; 352(6332): 249 – 251
- 61 *Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R.* Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281(1): 578 – 586
- 62 *Stevaux O, Dyson NJ.* A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Current opinion in cell biology* 2002; 14(6): 684 – 691
- 63 *Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E.* The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science (New York, N.Y.)* 1989; 243(4893): 934 – 937
- 64 *Kamper N, Day PM, Nowak T et al.* A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *Journal of virology* 2006; 80(2): 759 – 768
- 65 *Day PM, Thompson CD, Schowalter RM, Lowy DR, Schiller JT.* Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection. *Journal of virology* 2013; 87(7): 3862 – 3870
- 66 *DiGiuseppe S, Bienkowska-Haba M, Hilbig L, Sapp M.* The nuclear retention signal of HPV16 L2 protein is essential for incoming viral genome to transverse the trans-Golgi network. *Virology* 2014; 458-459: 93 – 105

- 
- 67 DiGiuseppe S, Keiffer TR, Bienkowska-Haba M et al. Topography of the Human Papillomavirus Minor Capsid Protein L2 during Vesicular Trafficking of Infectious Entry. *Journal of virology* 2015; 89(20): 10442 – 10452
- 68 Roset Bahmanyar E, Paavonen J, Naud P et al. Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrolment in the multinational PATRICIA trial. *Gynecologic oncology* 2012; 127(3): 440 – 450
- 69 Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England journal of medicine* 1998; 338(7): 423 – 428
- 70 Tan SC, Ankathil R. Genetic susceptibility to cervical cancer: role of common polymorphisms in apoptosis-related genes. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2015;
- 71 Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control* 2015; 64(RR-03): 1 – 137
- 72 Castellsague X, Drudis T, Canadas MP et al. Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC infectious diseases* 2009; 9: 74
- 73 Chatzistamatiou K, Sotiriadis A, Agorastos T. Effect of mode of delivery on vertical human papillomavirus transmission - A meta-analysis. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology* 2016; 36(1): 10 – 14
- 74 Watts DH, Koutsky LA, Holmes KK et al. Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus. Results from a prospective cohort study. *American journal of obstetrics and gynecology* 1998; 178(2): 365 – 373
- 75 Kawana K, Yasugi T, Yoshikawa H et al. Evidence for the presence of neutralizing antibodies against human papillomavirus type 6 in infants born to mothers with condyloma acuminata. *American journal of perinatology* 2003; 20(1): 11 – 16
- 76 Silverberg MJ, Thorsen P, Lindeberg H, Grant LA, Shah KV. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstetrics and gynecology* 2003; 101(4): 645 – 652

- 
- 77 Mindel A, Tideman R. HPV transmission--still feeling the way. *Lancet* (London, England) 1999; 354(9196): 2097 – 2098
- 78 Casalegno J-s, Le Bail Carval K, Eibach D et al. High risk HPV contamination of endocavity vaginal ultrasound probes: an underestimated route of nosocomial infection? *PloS one* 2012; 7(10): e48137
- 79 Robert Koch-Institut. Impfquoten bei der Schuleingangsuntersuchung in Deutschland 2014. *Epidemiologisches Bulletin*, 2016. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2016/Ausgaben/16\\_16.pdf?\\_\\_blob=publicationFile#page=1&zoom=auto,-107,848](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2016/Ausgaben/16_16.pdf?__blob=publicationFile#page=1&zoom=auto,-107,848), 23.08.2017
- 80 Munoz N, Bosch FX, Castellsague X et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International journal of cancer* 2004; 111(2): 278 – 285
- 81 Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut / Stand: Juli 2012, 2012. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2012/Ausgaben/30\\_12.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2012/Ausgaben/30_12.pdf?__blob=publicationFile), 22.08.2017
- 82 Winer RL, Hughes JP, Feng Q et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *The New England journal of medicine* 2006; 354(25): 2645 – 2654
- 83 Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology* 2010; 118(1 Suppl): 7
- 84 Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274(9): 5810 – 5822
- 85 Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *Journal of virology* 2006; 80(18): 8940 – 8950
- 86 Selinka H-C, Florin L, Patel HD et al. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. *Journal of virology* 2007; 81(20): 10970 – 10980
- 87 Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to

- cell surface binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106(48): 20458 – 20463
- 88 *Day PM, Lowy DR, Schiller JT*. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003; 307(1): 1 – 11
- 89 *Smith JL, Campos SK, Wandering-Ness A, Ozbun MA*. Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *Journal of virology* 2008; 82(19): 9505 – 9512
- 90 *Frazer IH*. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology* 2009; 384(2): 410 – 414
- 91 *Wang H-K, Duffy AA, Broker TR, Chow LT*. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. *Genes & development* 2009; 23(2): 181 – 194
- 92 *Steenbergen RDM, Snijders PJF, Heideman DAM, Meijer, Chris J L M*. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nature reviews. Cancer* 2014; 14(6): 395 – 405
- 93 *Pett M, Coleman N*. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *The Journal of pathology* 2007; 212(4): 356 – 367
- 94 *McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Munger K*. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(5): 2130 – 2135
- 95 *Rosamilia C, Feichter G, Tzankov A, Obermann EC*. Diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasias. *Der Pathologe* 2012; 33(2): 118 – 123
- 96 *Kudela E, Holubekova V, Farkasova A, Danko J*. Determination of malignant potential of cervical intraepithelial neoplasia. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2016; 37(2): 1521 – 1525
- 97 *Mirabello L, Sun C, Ghosh A et al*. Methylation of human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical precancer in a Costa Rican population. *Journal of the National Cancer Institute* 2012; 104(7): 556 – 565

- 
- 98 *Wentzensen N, Sun C, Ghosh A et al.* Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 genomes and cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Journal of the National Cancer Institute* 2012; 104(22): 1738 – 1749
- 99 *Eden S, Cedar H.* Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Current opinion in genetics & development* 1994; 4(2): 255 – 259
- 100 *Wentzensen N, Vinokurova S, Knebel Doeberitz M von.* Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer research* 2004; 64(11): 3878 – 3884
- 101 *Wentzensen N.* Molecular diagnosis of HPV infections. *Der Pathologe* 2011; 32(6): 461 – 466
- 102 *Brismar S, Johansson B, Borjesson M, Arbyn M, Andersson S.* Follow-up after treatment of cervical intraepithelial neoplasia by human papillomavirus genotyping. *American journal of obstetrics and gynecology* 2009; 201(1): 17
- 103 *Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L et al.* Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *The Lancet. Oncology* 2012; 13(1): 78 – 88
- 104 *Burger EA, Kornor H, Klemp M, Lauvrak V, Kristiansen IS.* HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia. A systematic review. *Gynecologic oncology* 2011; 120(3): 430 – 438
- 105 *Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L et al.* Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2008; 17(11): 3033 – 3042
- 106 *RP.* Ausgabe 2/2013: Ulrike Wieland, Köln- HPV – Infektion: Virologische Aspekte. <https://www.hivandmore.de/archiv/2013-2/hpv-infektion-virologische-aspekte.shtml>, 28.08.2017
- 107 *Cuschieri K, Wentzensen N.* Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2008; 17(10): 2536 – 2545



- 
- 108 *Sotlar K, Stubner A, Diemer D et al.* Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *Journal of medical virology* 2004; 74(1): 107 – 116
- 109 *Castle PE, Dockter J, Giachetti C et al.* A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007; 13(9): 2599 – 2605
- 110 *Cattani P, Siddu A, D'Onghia S et al.* RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. *Journal of clinical microbiology* 2009; 47(7): 2136 – 2141
- 111 *Galloway DA.* Serological assays for the detection of HPV antibodies. *IARC scientific publications* 1992;(119): 147 – 161
- 112 *Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH.* Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *The American journal of surgical pathology* 2010; 34(8): 1077 – 1087
- 113 *Traut HF, Papanicolaou GN.* Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. *California and western medicine* 1943; 59(2): 121 – 122
- 114 *Robert Koch Institut.* Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - 3.10 Gebärmutterhals
- 115 *Luttmer R, De Strooper, Lise M A, Steenbergen RDM et al.* Management of high-risk HPV-positive women for detection of cervical (pre)cancer. *Expert review of molecular diagnostics* 2016: 1 – 14
- 116 *Betschart C, Ghisu G-P, Fink D.* *Praxis* 2016; 105(23): 1363 – 1369
- 117 *Chow LT, Broker TR, Steinberg BM.* The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2010; 118(6-7): 422 – 449
- 118 *Griesser H, Marquardt K, Jordan B, et al.* Gynäkologische Zytodiagnostik der Zervix: Münchner Nomenklatur III. *Frauenarzt* 2013
- 119 *Muller K, Soergel P, Hillemanns P, Jentschke M.* Accuracy of Colposcopically Guided Diagnostic Methods for the Detection of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 2016; 76(2): 182 – 187

- 120 Ostor AG, Mulvany N. The pathology of cervical neoplasia. Current opinion in obstetrics & gynecology 1996; 8(1): 69 – 73
- 121 Martin-Hirsch PPL, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson HO. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. The Cochrane database of systematic reviews 2013;(12): CD001318
- 122 Wright TC, JR, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. Journal of lower genital tract disease 2007; 11(4): 223 – 239
- 123 Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ). A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. British journal of obstetrics and gynaecology 1989; 96(9): 1054 – 1060
- 124 Jin G, LanLan Z, Li C, Dan Z. Pregnancy outcome following loop electrosurgical excision procedure (LEEP) a systematic review and meta-analysis. Archives of gynecology and obstetrics 2014; 289(1): 85 – 99
- 125 Duesing N, Schwarz J, Choschzick M et al. Assessment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) with colposcopic biopsy and efficacy of loop electrosurgical excision procedure (LEEP). Archives of gynecology and obstetrics 2012; 286(6): 1549 – 1554
- 126 Mathevet P, Dargent D, Roy M, Beau G. A randomized prospective study comparing three techniques of conization: cold knife, laser, and LEEP. Gynecologic oncology 1994; 54(2): 175 – 179
- 127 Arbyn M, Kyrgiou M, Gondry J, Petry KU, Paraskevaidis E. Long term outcomes for women treated for cervical precancer. BMJ (Clinical research ed.) 2014; 348: f7700
- 128 Strander B, Hallgren J, Sparen P. Effect of ageing on cervical or vaginal cancer in Swedish women previously treated for cervical intraepithelial neoplasia grade 3: population based cohort study of long term incidence and mortality. BMJ (Clinical research ed.) 2014; 348: f7361
- 129 Coffey K, Gaitskell K, Beral V et al. Past cervical intraepithelial neoplasia grade 3, obesity, and earlier menopause are associated with an increased risk of vulval cancer in postmenopausal women. British journal of cancer 2016;

- 
- 130 Cuzick J, Szarewski A, Cubie H *et al.* Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* (London, England) 2003; 362(9399): 1871 – 1876
- 131 Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR *et al.* Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 95(1): 46 – 52
- 132 Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM *et al.* Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* (London, England) 2014; 383(9916): 524 – 532
- 133 Bollen LJ, Tjong-A-Hung SP, van der Velden J *et al.* Human papillomavirus DNA after treatment of cervical dysplasia: low prevalence in normal cytologic smears. *Cancer* 1996; 77(12): 2538 – 2543
- 134 Chua KL, Hjerpe A. Human papillomavirus analysis as a prognostic marker following conization of the cervix uteri. *Gynecologic oncology* 1997; 66(1): 108 – 113
- 135 Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ *et al.* HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstetrical & gynecological survey* 2004; 59(7): 543 – 553
- 136 Reich O, Lahousen M, Pickel H, Tamussino K, Winter R. Cervical intraepithelial neoplasia III: long-term follow-up after cold-knife conization with involved margins. *Obstetrics and gynecology* 2002; 99(2): 193 – 196
- 137 Sadler L, Saftlas A, Wang W, Exeter M, Whittaker J, McCowan L. Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery. *JAMA* 2004; 291(17): 2100 – 2106
- 138 AWMF-Leitlinien-Register. Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV- Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale, 2013. [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/015-027\\_S2\\_IDA\\_Praevention\\_Diagnostik\\_Therapie\\_HPV-Infektion\\_weiblicher\\_Genitale\\_2009-abgelaufen.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-027_S2_IDA_Praevention_Diagnostik_Therapie_HPV-Infektion_weiblicher_Genitale_2009-abgelaufen.pdf), 12.01.2016
- 139 Suh-Burgmann EJ, Whall-Strojwas D, Chang Y, Hundley D, Goodman A. Risk factors for cervical stenosis after loop electrocautery excision procedure. *Obstetrics and gynecology* 2000; 96(5 Pt 1): 657 – 660

- 
- 140 Castanon A, Landy R, Brocklehurst P *et al.* Risk of preterm delivery with increasing depth of excision for cervical intraepithelial neoplasia in England. Nested case-control study. *BMJ (Clinical research ed.)* 2014; 349: g6223
- 141 Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)* 2006; 367(9509): 489 – 498
- 142 Khalid S, Dimitriou E, Conroy R *et al.* The thickness and volume of LLETZ specimens can predict the relative risk of pregnancy-related morbidity. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 2012; 119(6): 685 – 691
- 143 Noehr B, Jensen A, Frederiksen K, Tabor A, Kjaer SK. Depth of cervical cone removed by loop electrosurgical excision procedure and subsequent risk of spontaneous preterm delivery. *Obstetrics and gynecology* 2009; 114(6): 1232 – 1238
- 144 Samson S-LA, Bentley JR, Fahey TJ, McKay DJ, Gill GH. The effect of loop electrosurgical excision procedure on future pregnancy outcome. *Obstetrics and gynecology* 2005; 105(2): 325 – 332
- 145 Jakobsson M, Gissler M, Sainio S, Paavonen J, Tapper A-M. Preterm delivery after surgical treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstetrics and gynecology* 2007; 109(2 Pt 1): 309 – 313
- 146 Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C *et al.* Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)* 2008; 337: a1284
- 147 Albrechtsen S, Rasmussen S, Thoresen S, Irgens LM, Iversen OE. Pregnancy outcome in women before and after cervical conisation: population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)* 2008; 337: a1343
- 148 Bjorge T, Skare GB, Bjorge L, Trope A, Lonnberg S. Adverse Pregnancy Outcomes After Treatment for Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstetrics and gynecology* 2016;
- 149 Kyrgiou M, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Paraskevaidis E. Increased risk of preterm birth after treatment for CIN. *BMJ (Clinical research ed.)* 2012; 345: e5847

- 
- 150 Zhang H, Zhang T, You Z, Zhang Y. Positive Surgical Margin, HPV Persistence, and Expression of Both TPX2 and PD-L1 Are Associated with Persistence/Recurrence of Cervical Intraepithelial Neoplasia after Cervical Conization. *PloS one* 2015; 10(12): e0142868
- 151 Persson M, Brismar Wendel S, Ljungblad L, Johansson B, Weiderpass E, Andersson S. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA and L1 DNA as markers of residual/recurrent cervical intraepithelial neoplasia. *Oncology reports* 2012; 28(1): 346 – 352
- 152 Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 1993; 12(2): 186 – 192
- 153 Jaisamrarn U, Castellsague X, Garland SM et al. Natural history of progression of HPV infection to cervical lesion or clearance: analysis of the control arm of the large, randomised PATRICIA study. *PloS one* 2013; 8(11): e79260
- 154 Strander B, Andersson-Ellstrom A, Milsom I, Sparen P. Long term risk of invasive cancer after treatment for cervical intraepithelial neoplasia grade 3. Population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)* 2007; 335(7629): 1077
- 155 Schwarz TM, Kolben T, Gallwas J, Crispin A, Dannecker C. Comparison of two surgical methods for the treatment of CIN. Classical LLETZ (large-loop excision of the transformation zone) versus isolated resection of the colposcopic apparent lesion - study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015; 16: 225
- 156 van den Brule AJC, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJLM, Snijders PJF. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *Journal of clinical microbiology* 2002; 40(3): 779 – 787
- 157 Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJF, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44(2): 504 – 512
- 158 Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel

- broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46(3): 1050 – 1059
- 159 *Herfs M, Somja J, Howitt BE et al.* Unique recurrence patterns of cervical intraepithelial neoplasia after excision of the squamocolumnar junction. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2015; 136(5): 1043 – 1052
- 160 *Trope A, Jonassen CM, Sjoborg KD et al.* Role of high-risk human papillomavirus (HPV) mRNA testing in the prediction of residual disease after conisation for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic oncology* 2011; 123(2): 257 – 262
- 161 *Bae JH, Kim CJ, Park TC, Namkoong SE, Park JS.* Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2007; 17(6): 1271 – 1277
- 162 *Leiman G, Harrison NA, Rubin A.* Pregnancy following conization of the cervix: complications related to cone size. *American journal of obstetrics and gynecology* 1980; 136(1): 14 – 18
- 163 *Kyrgiou M, Athanasiou A, Paraskevaïdi M et al.* Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)* 2016; 354: i3633
- 164 *Song T, Seong SJ, Kim B-G.* Regeneration Process After Cervical Conization for Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstetrics and gynecology* 2016;
- 165 *Kyrgiou M, Valasoulis G, Stasinou S-M et al.* Proportion of cervical excision for cervical intraepithelial neoplasia as a predictor of pregnancy outcomes. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2015; 128(2): 141 – 147
- 166 *Kocken M, Helmerhorst TJM, Berkhof J et al.* Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. *The Lancet. Oncology* 2011; 12(5): 441 – 450

- 
- 167 Klug SJ, Hukelmann M, Hollwitz B et al. Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *Journal of medical virology* 2007; 79(5): 616 – 625
- 168 Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedal H, Karlsen F, Hagmar B. Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *British journal of cancer* 2004; 90(7): 1407 – 1413
- 169 Venturoli S, Ambretti S, Cricca M et al. Correlation of high-risk human papillomavirus genotypes persistence and risk of residual or recurrent cervical disease after surgical treatment. *Journal of medical virology* 2008; 80(8): 1434 – 1440
- 170 Soderlund-Strand A, Kjellberg L, Dillner J. Human papillomavirus type-specific persistence and recurrence after treatment for cervical dysplasia. *Journal of medical virology* 2014; 86(4): 634 – 641
- 171 Gok M, Coupe VMH, Berkhof J et al. HPV16 and increased risk of recurrence after treatment for CIN. *Gynecologic oncology* 2007; 104(2): 273 – 275
- 172 Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *The Journal of infectious diseases* 2007; 195(11): 1582 – 1589
- 173 Motamedi M, Bohmer G, Neumann HH, Wasielewski R von. CIN III lesions and regression. Retrospective analysis of 635 cases. *BMC infectious diseases* 2015; 15: 541
- 174 Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer letters* 2011; 305(2): 113 – 122
- 175 Zhang L, Yang B, Zhang A et al. Association between human papillomavirus type 16 E6 and E7 variants with subsequent persistent infection and recurrence of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion after conization. *Journal of medical virology* 2016; 88(11): 1982 – 1988

- 176 Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer research* 2008; 68(1): 307 – 313



## 8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	entionisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA (deutsch: komplementäre DNS)
CIN	zervicale intraepitheliale Neoplasie
CIS	Carzinoma in situ
d.h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECO ROCS	Evaluation of Clinical Outcome after Reduction of Conization Size
g	Gramm
g	Gravitationsbeschleunigung
HPV	humaner Papillomavirus
HSIL	high squamous intraepithelial lesion
l	Liter
LEEP	Loop electrosurgical excision procedure
LLETZ	Large loop excision of the transformation zone
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LSIL	low squamous intraepithelial lesion
M	Monate
min	Minute
ml	Milliliter
NN	nicht nachweisbar
p53	apoptoseförderndes Protein 53
Pap	Papanicolaou (Färbemethode für Zervixabstriche)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pondus Hydrogenii
pRB	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SIL	squamöse regulatory region
SIL	squamous intraepithelial lesion
Taq	lat. Thermus aquaticus
URR	upstream regulatory region
UV	Ultraviolett

Sonstige Abkürzungen werden im Text erläutert.

## 9 **Danksagung**

Ich möchte die Gelegenheit dazu nutzen mich bei folgenden Personen ganz herzlich zu bedanken:

Herrn Prof. Dr. med. Dannecker für die Vergabe und Betreuung der Dissertation.

Frau PD Dr. med. Theresa Kolben für die Betreuung, kritische Durchsicht und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Nüssler für die mentale Unterstützung während des Verfassens der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. Sotlar für die Bereitstellung aller Räumlichkeiten und Materialien für den experimentellen Teil der Arbeit und seinen Mitarbeitern Herrn Daniel Hofmann, Frau Simone Wehner, Herrn Dr. med. Harald Bartsch und Frau Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter.

Herrn PD Dr. med Andreas Kaufmann für die Genotypisierung und Kooperation.

Bei allen teilnehmenden Zentren für die gute Zusammenarbeit: Medizinische Hochschule Hannover Frau Dr. med. Monika Noskowicz, Mare Klinikum Kiel und amedes MVZ Herrn Dr. med. Bergauer.

Frau Vogel und Frau Rahmeh für die zuverlässige und sorgfältige Koordination bei der zytologischen Auswertung der Proben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Simon Tank für die Unterstützung in allen technischen Fragestellungen.

Herrn Dr. med. Crispin für seine geduldige Beratung in allen statistischen Fragestellungen.

## Eidesstattliche Versicherung

Etzel, Lea Teresa

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Vergleich zweier operativer Vorgehensweisen im Rahmen der Therapie der CIN III: klassische LLETZ (Large Loop Excision of the Transformation Zone) versus isolierte Resektion der kolposkopisch sichtbaren Läsion

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.02.2018

---

Ort, Datum

Lea Teresa Etzel

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand